

Doktori (Ph.D.) értekezés

**A NÖVÉNYI ANTIOXIDÁNS VÉDEKEZŐRENDSZER
ENZIMATIKUS ELEMEINEK VÁLTOZÁSA SÓ (NaCl) STRESSZ
HATÁSÁRA**

Írta

Rios-Gonzalez Krisztina

Témavezető

Dr. Erdei László

a biológia tudományok doktora

Dr. Veisz Ottó

az MTA doktora

Magyar Tudományos Akadémia
Mezőgazdasági Kutatóintézete, Martonvásár

2002

Családomnak

„Soha ne szégyelljük kimondani: nem tudom. Kevés mondat van a nyelvünkben, amely ennél gyümölcsözőbb volna. Ha beismerjük tudatlanságunkat, rájövünk, hogy a világ tele van emberekkel, akik abban lelik legnagyobb gyönyörűségüket, hogy taníthatnak minket.”

Gerald Durrell

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések	3
1. Bevezetés	5
2. Irodalmi áttekintés	7
2.1. Stresszelméletek	7
2.2. Oxidatív stressz	8
2.3. Stresszválaszok és nyomonkövetésük	10
2.4. A só, mint stressztényező	16
2.5. Nitrogénforrás hatása	17
2.6. Napiritmus változásai	18
2.7. Aldehid oxidáz	19
3. Kutatási célok	21
4. Anyagok és módszerek	22
4.1. Növénynevelés, mintavétel	22
4.2. Mintaelőkészítés enzimaktivitás méréséhez	24
4.3. Enzimaktivitás meghatározása	24
4.4. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)	25
4.5. Festési eljárások, enzimaktivitás meghatározása gélben	26
4.6. Sejtalkotók preparálása	27
4.7. Matematikai analízis	28
5. Eredmények	29
5.1. A glutation reduktáz aktivitásának vizsgálata időben, különböző mértékű sókezelés (NaCl) mellett	29
5.1.1. Glutation reduktáz aktivitásának változása különböző sókoncentrációk esetén	29
5.1.2. Glutation-reduktáz enzim aktivitásának időbeli változása	30
5.2. Nitrogén és NaCl együttes hatásának vizsgálata kukorica és napraforgó növényeken	32
5.2.1. Különböző nitrogénforrás (NH_4^+ , NO_3^-) antioxidáns enzimekre gyakorolt hatása	32
5.2.2. A különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és sókezelt (100 mM NaCl) kukorica és napraforgó növények biomassa produkciója	35

5.2.3. Antioxidáns enzimek aktivitásának változása sókezelés (100 mM NaCl) hatására különböző nitrogénforráson nevelt növények esetében.....	36
5.2.4. Antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és NaCl kezelt kukorica növények különböző gyökérrégióiban.....	39
5.3. A sókezelés (100 mM NaCl) és a különböző nitrogénforrások hatásának vizsgálata búzában.....	41
5.3.1. A NaCl kezelés és a különböző nitrogénforrások hatása 3 búzafajta biomassza produkciójára.....	41
5.3.2. A NaCl kezelés és a különböző nitrogénforrások hatása az antioxidáns enzimek izoenzim összetételére búza levélben és gyökérben.....	42
5.4. Az antioxidáns enzimek működésének statisztikai összehasonlítása sókezelt (100 mM NaCl) növényekben.....	46
5.5. Aldehid oxidáz jelenlétének vizsgálata kukorica gyökér mitokondriumban és peroxiszómában.....	47
6. Az eredmények értékelése.....	49
6.1. Sókezelés hatása a glutation reduktáz (GR) aktivitására és napi ritmusára.....	49
6.2. A só és különböző nitrogénforrások hatása a növények antioxidáns enzimrendszerére.....	51
6.3. Az antioxidáns enzimek működésének statisztikai összehasonlítása sókezelt (100 mM NaCl) növényekben.....	59
6.4. Aldehid oxidáz enzim jelenlétének vizsgálata kukorica gyökér mitokondriumban és peroxiszómában.....	60
7. Összefoglalás.....	61
8. Summary.....	64
9. Irodalomjegyzék.....	67
Köszönetnyilvánítás.....	78

RÖVIDÍTÉSEK

AA	aszkorbinsav
AO	aldehid oxidáz
ATP	adenozin 5'-trifoszfát
BSA	bovine serum albumin
CDNB	1-klór-2,4-dinitro-benzoészav
DCIP	diklórfenol-indofenol
DTNB	5,5'-ditio- <i>bis</i> -(2-nitro-benzoészav)
DW	száraz tömeg
EDTA	etilén-diamin-tetraecészav
EU	enzim egység
FW	friss tömeg
GAS	általános adaptációs szindróma
GPx	guajakol peroxidáz
GR	glutation redukáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
GST	glutation-S-transzferáz
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazin-N'-[2-etánszulfonsav])
I-3-A	indol-3-aldehid
Kat	kataláz
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromid
NADP	β -nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát, oxidált forma
NADPH	β -nikotinsavamid-adenin-dinukleotid-foszfát, redukált forma
NBT	nitroblue-tetrazolium
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
PAN	peroxi acetilnitril
PMS	fenazin-metaszulfát
PSII	II. fotokémiai rendszer
PVP	polivinil-pirrolidon
PVPP	polivinil-polipirrolidon
Rpm	fordulat per perc

SOD	szuperoxid dizmutáz
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin
UDP	uridin-5'-difoszfát
UV	ultraibolya tartományba eső hullámhosszú fény

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a növényélettani kutatásoknak jelentős részét a stresszkutatások teszik ki. Ez magyarázható egyrészt a bioszférában bekövetkező változásokkal:

- globális klímaváltozás,
- ózonlyuk kialakulásával az UV-B sugárzás növekedése,
- a szikes, sós talajok kialakulása,
- arid (sivatagos) területek kiterjedése;

másrészt azzal, hogy a növények válaszmechanizmusai, illetve az, hogy hogyan alkalmazkodnak a különböző stresszkörülményekhez, még nem teljesen ismert. A vizsgálatok intenzív és széleskörű elterjedéséhez gazdasági tényezők is hozzájárulnak, hiszen a kedvezőtlen körülmények a haszonnövényeknél tetemes minőségi és mennyiségi veszteséget okoznak évente, és ez az élelmiszerellátásban gondokhoz vezethet.

A környezetben bekövetkezett változásokat nyomon követve megállapíthatjuk, hogy bizonyos folyamatok már visszafordíthatatlanul elindultak. Ilyen esetekben nem tehetünk mást, mint hogy megpróbálunk alkalmazkodni a megváltozott körülményekhez. Mindez a növényvilágra is érvényes, így a növénynemesítőknek ezt szem előtt kell tartaniuk. Mindezeket figyelembe véve a kísérletek távolabbi célja az lehet, hogy a védekezőmechanizmusok vizsgálata során kapott eredményeket felhasználva, bizonyos fajok kedvező tulajdonságait kiemelve, a növénynemesítők új, nagyobb ellenállóképességgel rendelkező fajtákat állítsanak elő, és ezért vizsgálatainkat mezőgazdasági növényekkel (búza, kukorica és napraforgó) végeztük.

Minden stresszhatásnak van oxidatív komponense, így a növények az őket érő külső hatásokon keresztül egyfajta oxidatív stressznek is ki vannak téve. Ez szabad gyökök és aktivált oxigénformák koncentrációjának növekedésében nyilvánul meg. E hatások kivédésére egy összetett, enzimatis és nem enzimatis elemekből álló antioxidáns rendszer épült ki. A külső környezet változásainak hatása jól mérhető ezen rendszer enzimatis elemeinek aktivitásán keresztül.

Irodalmi adatok alapján ismert volt, hogy a só stressznek is van oxidatív komponense, és sókezelt növényekben az antioxidáns enzimek aktivitása megváltozott. Munkánkban két oldalról közelítettük meg a só stressz hatásának vizsgálatát. Vizsgáltuk a glutation reduktáz enzim aktivitásának napi változását (napi ritmusát), valamint azt, hogy a különböző mértékű só stressz milyen hatással van erre a ritmusra. Ezenkívül a sókezelés

hatását tanulmányoztuk különböző nitrogénforráson nevelt növényekben, kutatva, vajon nitrogénanyagcsere oldaláról milyen stressz érheti a növényt, valamint a két, eltérő környezeti faktor (só és eltérő nitrogénforrások) együttes alkalmazása miként nyilvánul meg az antioxidáns enzimek aktivitásában.

Figyelmünk középpontjába került egy másik enzim, mely nem antioxidáns, de stresszenzimként kezelik, és aktivitása növekedést mutat só stressz hatására. Ez az aldehid oxidáz enzim. Az enzim sejten belüli lokalizációjáról próbáltunk vizsgálatainkkal újabb információkkal szolgálni.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

„Stress – spice of life or kiss of death?” (Levi, 1997) Stressz – az élet sója vagy a halál csókja? Ez a kérdés az 1997-ben Budapesten megrendezett „Stress of Life” konferencia egyik előadásának címe volt. A kérdés érdekes és elgondolkodtató. Maga a „stressz” kifejezés mind gyakrabban jelzője rohanó életritmusunknak, a minket körülvevő változásoknak. Egyes kutatók elkülönítik a kedvező (eu-) és kedvezőtlen (disstress) hatásokat (Lichtenthaler, 1996), mégis az esetek többségében e kifejezés számunkra negatív jelentéssel bír. A külső hatások, a környezetben bekövetkező változások nemcsak ránk, hanem környezetünk többi élő elemére, így a növényekre is hatással vannak. Növények gyakran élnek számukra kedvezőtlen körülmények között. Az összetett adaptációs mechanizmusok, a szélsőséges tényezőkhez való alkalmazkodás feltárása, mind alaposabb megismerése nemcsak természeti értékeink megóvása szempontjából fontos. A vizsgálatok intenzív és széleskörű elterjedéséhez gazdasági tényezők is hozzájárulnak, hiszen a kedvezőtlen körülmények a haszonnövényeknél tetemes minőségi és mennyiségi veszteséget okoznak évente, és ez az élelmiszerellátásban gondokhoz vezethet (Boyer, 1982).

2.1. Stresszelméletek

A stressz, mint fogalom definiálása Selye János nevéhez kötődik, aki szerint a stressz, „egy fajlagos tünetcsoportban megnyilvánuló állapot, mely magában foglal minden nem fajlagosan előidézett elváltozást egy biológiai rendszeren belül” (Selye, 1956). Stresszornak tekinthető bármely faktor, vagy ágens, amely a stresszt okozza. A stressz hatását, lehetséges lefolyását foglalja össze az általános adaptációs szindróma (General Adaptation Syndrome GAS), melynek fázisai:

- Cannon-féle vészreakció,
- ellenállás, vagy rezisztencia,
- kimerülés.

Későbbiekben többen módosították, specializálták a fogalmakat. Lichtenthaler (1996) szerint minden olyan körülményt, vagy anyagot, ami kedvezőtlen hatással van a növények anyagcseréjére, növekedésére, vagy fejlődésére, stressznek tekintünk. Növényi stresszhatást különböző természetes, és antropogén stresszfaktorok válthatnak ki.

Természetes stresszfaktorok: - az erős fénysugárzás,

- hőmérséklet (alacsony vagy magas),
- vízhiány,
- ásványi anyagok hiánya,
- anoxia,
- rovarok, gombák, virális és bakteriális patogének.

Antropogén stresszfaktorok: - herbicidek, fungicidek, inszekticidek,

- légszennyező anyagok (pl.: O₃, SO₂, NO_x, PAN),
- nagy reaktivitású oxigén származékok keletkezése,
- fotooxidánsok,
- savas esők, savas pH a talajban és vízben,
- túlzott N-műtrágyázás,
- nehézfém szennyezés,
- túl sok ammónia kibocsátás,
- UV-A és UV-B sugárzás növekedése,
- CO₂ szint emelkedése és globális klímaváltozás.

Hatásuk alapján elkülönítünk gyenge és erős stresszhatást. A gyenge stressz hatását az akklimatizáció, az adaptáció és a javító, ún. „repair” mechanizmusok részben kompenzálják. Az erős stressz jelentős károkat okoz, ami végül a sejt és a növény halálához is vezethet.

Mindezen hatások a szervezet anyagcseréjében bizonyos reakcióutakat felgyorsítanak vagy gátolnak, ami olyan köztes- és végtermékek felhalmozódását, esetleg megjelenését eredményezi, amelyek az ismert biokémiai utakat valamelyik irányba eltolják. Ezek közül a biokémiai folyamatok közül az oxidációs-redukciós állapotváltozások a leggyorsabban lezajló molekuláris szintű változások közé tartoznak a szervezetben, amit összefoglalóan az oxidatív stressz hatásának nevezünk. Az egyes stresszfolyamatok közös jellemzője, hogy mindegyiknek van oxidatív stressz komponense (Smirnoff, 1993; Foyer és Mullineaux, 1994).

2.2. Oxidatív stressz

Az oxidatív stressz – amit reaktív oxigén tartalmú gyökök és vegyületek káros hatásai eredményeznek – fontos jelenség számos biológiai rendszerben (Bowler és mtsai, 1992). Érdekes ellentmondás, hogy míg az aerob szervezeteknek az élethez

elengedhetetlen szükségük van oxigénre, addig a legnagyobb veszélyt is ez a molekula, illetve származékai, melyek az aerob élet következményei, hordozzák magukban.

A szabad gyökök, illetve gerjesztett molekulák az élő, aerob szervezetekben keletkezhetnek fiziológiás és patológias körülmények között endogén úton, valamint külső ágensek hatására exogén módon (Foyer és mtsai, 1994a; Shalata és Tal, 1998; Breusegem és mtsai, 2001). A szabad gyökökre jellemző, hogy külső elektrónhéjukon egy párosítatlan elektrón található. Ebből következően igen reaktívak és rövid élettartamúak. Az élő szervezetekre gyakorolt hatásukat tekintve a molekuláris oxigénből, általában az átmeneti-fémionok katalizálta folyamatokban keletkező gyökök a legjelentősebbek (Canedas, 1989) (1. táblázat). A szabad gyökök és gerjesztett molekulák biológiai forrásai lehetnek: sejtlégzés, fotoszintézis különböző vegyületek autooxidációja, enzimatisz folyamatok, illetve szubcelluláris organelumok és bizonyos sejtek működése. A szabad gyökök reakciói általában láncreakciók. A patológias szabadgyök-reakciók minden biomolekulát képesek károsítani: nukleinsavakat, lipideket, fehérjéket, szénhidrátokat (Foyer és munkatársai, 1994b).

1. táblázat: Reaktív oxigén tartalmú gyökök és vegyületek (Sies, 1985).

Vegyület, gyök		$t_{1/2}$ (mp)	Megjegyzés
$\cdot\text{O}_2^-$	szuperoxid gyök anion	10^{-6}	Jó redukáló és gyenge oxidálószer. Sok autooxidációs reakcióban képződik.
$\text{HO}_2\cdot$	perhidroxil gyök		$\cdot\text{O}_2^-$ protonált formája, lipidoldékonyabb.
H_2O_2	hidrogén peroxid		$\cdot\text{O}_2^-$ -ből ($\text{HO}_2\cdot$) dizmutációval, vagy közvetlenül O_2 -ből képződik. Enyhén oxidál, de nagy a diffúziós távolsága.
$\text{HO}\cdot$	hidroxil gyök	10^{-9}	Fenton és Haber-Weiss reakcióban képződik, igen reaktív, kicsi a diffúziós távolsága.
$\text{RO}\cdot$	alkoxi gyök	10^{-6}	$\text{HO}\cdot$ -hoz hasonlóan reaktív, de annál nagyobb a diffúziós távolsága.
$\text{ROO}\cdot$	peroxi gyök	10^{-2}	Gyengén oxidál, nagy a diffúziós távolsága.
ROOH	szerves hidroperoxid		
$^1\Delta_g\text{O}_2 (\text{O})$	szinglet molekuláris oxigén	10^{-6}	Erősen oxidáló tulajdonságú gerjesztett O_2 .
$^3\text{RO} (\text{RO}^*)$	gerjesztett karbonil		

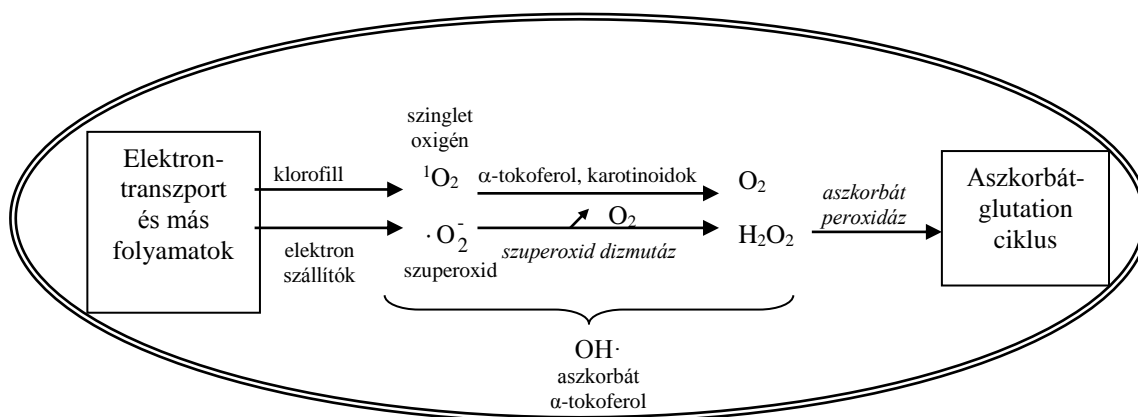
2.3. Stresszválaszok és nyomonkövetésük

A környezeti stresszhatások széles köre potenciális veszélyt jelent az élőlények számára, éppen a szabad gyökök és aktív oxigénszármazékok megnövekedett produkciója miatt (Foyer és Mullineaux, 1994). Mindez erőteljesebb hatásként fejeződik ki a növényi szervezetekben, más eukarióta szervezetekkel összehasonlítva, mivel egyrészt ők helyhez kötött életmódot folytatnak a körülöttük változó környezetben, másrészt a növényi sejtek oxigént szabadítanak fel a fotoszintézis során. Az aerob, élő szervezetek kialakulását és tartós fennmaradását a reaktív, oxigén tartalmú vegyületek, gyökök, gerjesztett molekulák elleni detoxifikáló rendszer kialakulása tette lehetővé (Foyer és mtsai, 1994b; Noctor és Foyer, 1998; Meneguzzo és mtsai, 1999). Ennek a védekezőrendszernek vannak enzimatis és nem enzimatis elemi is (2. táblázat).

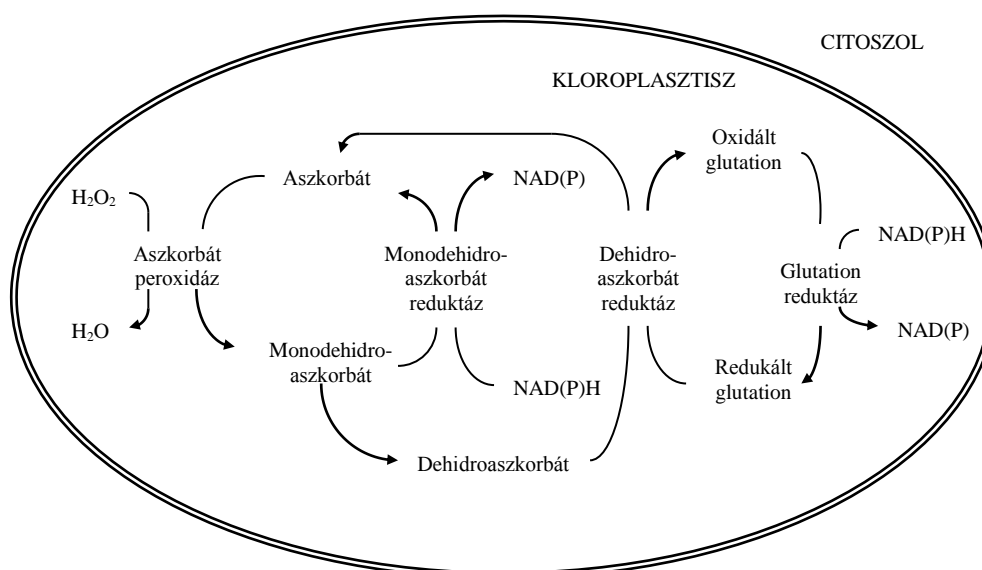
A betöltött funkció alapján beszélhetünk elsődleges és másodlagos védekezőrendszerekről. Az elsődleges védekezőrendszer az, amely a konkrét behatással szemben véd. Ide tartoznak a szabad gyökök és gerjesztett molekulák ellen kialakult védekezés elemi. Az oxigénből keletkező intermedierek toxikus hatásaival szemben az antioxidánsok védnek. Az antioxidánsok kis molekulájú vegyületek, melyek lehetnek zsírolékonyak (pl. α -tokoferol) és vízóldékonyak (pl. aszkorbinsav). Ezen vegyületek reakcióit a megfelelő antioxidáns enzimek katalizálják (pl. glutation reduktáz). A másodlagos védekezőrendszer feladata a már sérült részek kijavítása, illetve eltávolítása (pl. peroxiszóma). A sejtszintű stresszválasz lényegében ezen elemek aktivitásának megváltozásában mutatkozik meg. Ezt szükséges megjegyezni ahhoz, hogy megértsük: stressz hatására nem egy új védekezőrendszer fog kiépülni, hanem egy, már meglevő rendszer aktivitása változik meg. A védekezőrendszer felépítésének, és a detoxifikációs folyamatoknak az áttekintését segíti az 1. és 2. ábra. Az első ábra a gerjesztett molekulák „befogását” mutatja, míg a 2. ábrán az aszkorbát-glutacion ciklus folyamatai láthatók részletesen. A kialakuló stressztolerancia a különböző szerveződési (biokémiai, élettani, szerkezeti) szinteken megvalósuló adaptációs értékek összegeként fogható fel.

2. táblázat: Antioxidáns védekezőrendszerek az élő szervezetekben (Sies, 1985; Fehér és Vereckei, 1985).

Védőrendszer	Megjegyzés
<i>1. Nem enzimátikus</i>	
α -tokoferol (E-vitamin)	lipidoldható, membrán kötött gyökfogó
β -karotin, A-vitamin	lipidoldható, $^1\Delta_g\text{O}_2$ megkötő
Bilirubin	lipidoldható
Aszkorbinsav (C-vitamin)	vízoldható, gyökfogó, α -tokoferol regenerálása
Húgysav	vízoldható, $^1\Delta_g\text{O}_2$ megkötő, aszkorbinsav regenerálása
Glutation (GSH)	γ -glutamil-ciszteinil-glicin, peptidázok nem bontják, az élő szervezetek egyik legfontosabb antioxidánsa
Glükóz	$\text{HO}\cdot$ gyökfogó
Flavonoidok, fenol-karbonsavak	növényi antioxidánsok
Plazmaproteinek	pl. cöruoplazmin, transzferrin
Szintetikus antioxidánsok	pl. BHA (butil-hidroxianizol), BHT (butil-hidroxitoluol)
<i>2. Enzimátikus:</i>	
Szuperoxid-dizmutáz, SOD (EC 1.15.1.1)	Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD
GSH peroxidázok	citoszolban, mitokondriumban
Aszkorbát peroxidázok	növényekben az egyik legfontosabb peroxid-bontó enzimek
Kataláz (EC 1.11.1.6)	hem (Fe) tartalmú, hidrogén-peroxid bontó enzim, tetramer
<i>3. Kisegítő enzimrendszerek:</i>	
NADPH-kinon oxidoreduktáz	2 elektronos redukció, dikumarol érzékeny
Epoxid hidroxiláz	mikroszóma frakció, toxikus anyagok lebontási folyamatai
Kapcsolódó enzimrendszerek	UDP-glükoniltranszferáz szulfotranszferáz GSH-S-transzferáz
GSSG reduktáz, GR (EC 1.6.4.2)	NADPH függő enzim
NADPH források	glükóz-6-foszfát dehidrogenáz 6-foszfoglukonát dehidrogenáz izocitrát dehidrogenáz transzhydrogenázok
Transzportrendszerek	GSSG export



1. ábra: Az aktív oxigén gyökök keletkezése a kloroplasztiszbán, és az ehhez kapcsolódó detoxifikációs folyamatok (Foyer és munkatársai, 1994a)



2. ábra: Aszorbát-glutation ciklus a kloroplasztiszbán (Foyer és munkatársai, 1994a)

Több összefoglaló tanulmány vesz alapul e rendszer ismertetésénél állati szervezeten végzett kísérletekből származó adatokat. A növények védekezőrendszerének felépítése főbb szerkezetében azzal megegyező, de az egyes elemek megléte vagy hiánya még nem teljesen bizonyított. Éppen emiatt az ezzel összefüggő vizsgálatoknak két fő iránya van: 1.) az egyes komponensek felkutatása, 2.) magának a folyamatnak a vizsgálata pl. a stresszhatás és a válasz mértékének összefüggése, a stresszválasz időbeli lefutása, stb.

Antioxidáns enzimek

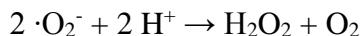
Az enzimatisz elemek nélkülözhetetlenek az oxigénnel teli légkörben való élethez. Ide tartoznak az aszkorbinsav-glutation ciklus enzime, valamint a peroxidázok és a kataláz. A toxikus elemek koncentrációjának növekedésére válaszul az antioxidáns

védekezőrendszer kapacitása megnő (Gressel és Galun, 1994), de a legtöbb esetben a válasz moderált. Az antioxidatív enzimek aktivitásában kimutatható növekedés, melyeket több élettani tanulmány bemutatott, azt a feltételezést erősíti meg, hogy az antioxidatív enzimszint szabályozása további stressz elleni védekezési képességgel ruházza fel a növényeket (Foyer és mtsai, 1994b). A védekező rendszer elemei egyrészt párhuzamosan működnek (több antioxidáns tölt be hasonló szerepet), másrészt kooperálhatnak (pl. SOD a katalázzal együtt alakítja át a $\cdot\text{O}_2^-$ -t vízzé) (Beckman és Ames, 1997).

Szuperoxid dizmutáz

A magasabbrendű növényekben a $\cdot\text{O}_2^-$ elsősorban a kloroplasztiszban keletkezik. Magas NADPH/NADP arány esetén e^- kerül a gerjesztett klorofillről vagy az I. fotokémiai rendszer elemeiről az O_2 -re. Ezenkívül több enzim is van (pl. aldehid oxidáz, xantin oxidáz, és más flavin dehidrogenázok), amely melléktermékként képes $\cdot\text{O}_2^-$ -t termelni (Fridovich, 1986).

A szuperoxid dizmutázok olyan fémtartalmú enzimek, amelyek a szuperoxid gyök dizmutációját katalizálják az alábbi reakció alapján:



Minden aerob szervezetben megtalálhatók, és leginkább a toxikus, redukált oxigéngyökök elleni védekezésben betöltött szerepüket vizsgálták. Növényekben három típusát különítették el:

- Cu/Zn SOD, mely elsősorban a citoszólban, de a kloroplasztisz sztrómájában, és a peroxiszómában is megtalálható,
- Mn SOD, melyet a mitokondriumban és peroxiszómában azonosítottak,
- Fe SOD, kloroplasztiszban azonosították, de nem minden esetben (Bowler és mtsai, 1992, 1994; Bueno és mtsai, 1995).

Szerkezetét tekintve lehet dimer, vagy tetramer (Stallings és mtsai, 1984). Stressz hatására az enzim aktivitásában gyakran változás figyelhető meg. Változó környezeti tényezők, - szárazság, hideg (chilling), anoxia, UV-B sugárzás - vagy akár patogén támadás a SOD aktivitásának megváltozását okozták (Monk és mtsai, 1989; Barabás és mtsai, 1998; Yu és Rengel, 1999). A transzgénikus növényekkel végzett kísérletek eredményei ellentmondóak. A dohányban túltermelt borsó kloroplasztisz Cu/Zn SOD növelte a növény paraquat indukálta oxidatív stresszel szembeni ellenállóságát (Sen Gupta és mtsai, 1993a).

Ezzel szemben a transzgénikus borsó növények – melyekben 2-4-szeres volt a kloroplasztisz Cu/Zn SOD túltermelés – nem voltak toleránsabbak a fénygátlást okozó körülményekkel szemben (Teppermann és Dunsmuir, 1990). Ezt a SOD tevékenységével párhuzamosan megnövekedett hidrogén peroxid koncentrációval magyarázzák.

Glutation reduktáz

A glutation reduktáz egy NADPH függő enzim, ami az oxidált glutation redukcióját katalizálja (Smith és mtsai, 1988; Inzé és Van Montagu, 1995):



Az aszkorbinsav-glutation ciklusban betöltött szerepét jól szemlélteti a 2. ábra. Többféle növényi szervezetből tisztították és azonosították. A molekula heterotetramer, 60 és 32 kDa nagyságú alegységekből épül fel, és molekulatömege 135 és 190 kDa között változik (Smith és mtsai, 1989). Főleg a kloroplaszt sztrómájában lokalizálódik, de azonosították a mitokondriumban és a citoszolban is (Foyer és mtsai, 1991). A növények egy részében nem sikerült izoformákat azonosítani, míg más esetekben többféle GR izoenzimet is azonosítottak (Foyer és mtsai, 1991; Hausladen and Alscher, 1994). Bielawsky és Joy (1986) különbséget talált borsóban a levél és gyökér izoformáiban. Az izoenzim összetétel változhat stresszhatásra a növény növekedése során (Guy és Carter, 1984; Edwards és mtsai, 1994). Az egyes izoformák aktivitásának változása eltérő lehet (Smith és mtsai, 1989). Különböző stressz körülmények között az enzim aktivitása általában növekszik, de csak olyan mértékben, hogy a védekező mechanizmus komponenseinek egyensúlyát fenntartsa (Foyer és mtsai, 1991). Ezek alapján feltételezik, hogy szerepet játszik a stressztolerancia és –rezisztencia kialakulásában (Smith és mtsai, 1989; Mitsuko és mtsai, 1991).

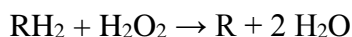
Kataláz

A H_2O_2 , ellentétben a többi oxigéntartalmú gyökkel, szabadon képes átdiffundálni a membránokon, így hatását (oxidatív stresszt okozva) a keletkezési helyétől távolabb is képes kifejteni. Jelentős mennyiségben keletkezik a különböző sejtorganellumokban, így pl. a mikrotestekhez kötött zsírsav β -oxidáció során, valamint a peroxisómális fotorespirációs reakciókban (Beevers, 1979; Tolbert, 1982). A korábban már említett

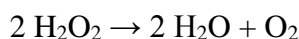
szuperoxid dizmutáz enzim tevékenysége révén, a $\cdot\text{O}_2^-$ semlegesítése során is keletkezik hidrogén peroxid.

A kataláz enzim egy hidrogén peroxidot lebontó enzim, mely a peroxisómában, a mitokondriumban és a citoszolban található. Tetramer, hem-tartalmú enzimről van szó, mely feladatát a H_2O_2 koncentrációjától függően két módon láthatja el:

Alacsony koncentráció esetén ($< 10^{-6}$ M) az enzim „peroxidáz” aktivitása működik, mely során különböző vegyületeket használ fel, mint hidrogén donort:



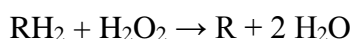
Amennyiben a H_2O_2 koncentrációja a fent említett kritikus koncentrációt meghaladja az enzim „kataláz” aktivitása működik, és ebben az esetben a hidrogén peroxid molekula tölti be mind a donor, mind az akceptor szerepét, így egyszerre két molekula H_2O_2 semlegesítődik.



Az enzimnek több izoformáját azonosították, melyek előfordulása genotípusonként, és fejlődési stádiumonként eltérő volt (Scandalios és mtsai, 1997).

Peroxidázok

A katalázok mellett a peroxidázok is részt vesznek a H_2O_2 semlegesítésében. A peroxidázok hem-tartalmú enzimek, melyek a hidrogén peroxid redukcióját katalizálják különböző szubsztrát oxidálása közben.



A széles skálán mozgó élettani funkciói között szerepel a korokozók és a stressz elleni védelem is (Hammerschmidt és mtsai, 1982; Elstner, 1982; Rao és mtsai, 1996). Külső stressz hatására pl.: UV-B sugárzás (Panagopoulos és mtsai, 1990), Cd (Hegedűs és mtsai, 2001) vagy szalicilsav (Janda és mtsai, 1999) a guajakol peroxidáz aktivitása nő.

Glutation-S-transzferáz

A glutation-S-transzferáz nem tekinthető antioxidáns enzimnek, mivel szabad gyökökkel közvetlenül nem reagál. Növényekben fő feladata a xenobiotikumok detoxifikációja. Dimer, multifunkcionális enzimről van szó, amely az elektrofil, hidrofób komponensek széles körét kapcsolja a glutationhoz, így járulva hozzá a sejt méregtelenítéséhez. Már több izoformáját azonosították (Mauch és Dudler, 1993).

Aktivitása több esetben nőtt herbicid és safener (bizonyos herbicidek hatását semlegesítő vegyületek) kezelés hatására (Dean és mtsai, 1990), öregedés során, illetve etilén kezelés következtében (Meyer és mtsai, 1991), valamint auxin kezelésre adott válaszként (Takahashi és Nagata, 1992).

2.4. A só, mint stressztényező

A csökkent vízpotenciál jól ismert következménye mind a só-, mind a szárazság-stressznek. E leggyakoribb környezeti stressz körülmények között a növények lecsökkentik a belső vízpotenciáljukat, hogy elkerüljék a kiszáradást (Erdei és mtsai, 1989; Erdei és Taleisnik, 1993). Az ozmózisnyomás növekedését szervetlen ionok felhasználásával, és/vagy szerves ozmotikumok szintézisével, mobilizálásával érik el a növények. Sóstressz (azaz a fiziológiai sókoncentrációnál magasabb ionkoncentráció, hiperozmózis) hatására az ionos válasz, míg szárazság stressznél az utóbbi folyamat, azaz szerves ozmotikumok szintézise és felhalmozódása lehet a jelentősebb (Erdei és mtsai, 1990). Az, hogy egy stresszhatás milyen mértékű választ vált ki, fajtól és fajtától függően változhat. A mezőgazdasági termelésben nagy jelentőségű gabonafélék és egyéb haszonnövények a legoptimálisabb esetben is csak kevésbé sótűrőek. A termesztés szempontjából fontos fajták kiválasztásához nélkülözhetetlen a tolerancia kialakulásának analitikai jellemzése és a mechanizmus teljes feltérképezése.

A só (NaCl) kezelés hatása az antioxidatív védekezőrendszer enzimikus elemeire

A NaCl egy olyan környezeti stresszfaktor, amely limitálja a növények növekedését és fejlődését. A növényi szervezet összetett módon válaszol a környezetében felhalmozódó, feleslegben lévő NaCl-ra. Mindez morfológiai, élettani és anyagcsere változásokat foglal magába. Az irodalmi adatok alapján a sóstressznek is, mint minden egyéb stressztípusnak van oxidatív komponense (De Kok és Oosterhuis, 1983; Hernández és mtsai, 1993), és ebből következik, hogy hatása követhető az antioxidatív védőrendszer vizsgálatával. Különböző növényekben, összetett vizsgálatokban elemezték a sókezelés antioxidáns enzimekre gyakorolt hatását.

A glutation reduktáz enzim aktivitását vizsgálva növekedést mutattak ki sókezelés hatására sótoleráns paradicsom kalluszban (Rodríguez-Rosales és mtsai, 1999). Búzában végzett kísérletek azt mutatták, hogy növekvő sókoncentráció mellett a GR aktivitása alig változik,

illetve csökken gyökérben, míg növekedést mutat levélben (Meneguzzo és mtsai, 1999). De Kok és mtsai (1983) azt találták, hogy az emelkedő sókoncentráció nincs hatással a GR aktivitására spenót levélben.

A szuperoxid dizmutáz enzim sókezelésre csökkenő enzimaktivitással válaszolt rizsben (Dionisio-Sese és Tobita, 1998) és sókezelésre érzékeny paradicsom (Shalata és Tal, 1998) növényekben, míg sótoleráns paradicsomban (Shalata és Tal, 1998; Rodríguez-Rosales és mtsai, 1999) az enzim aktivitása nőtt.

Kataláz esetében Rodríguez-Rosales és mtsai (1999) találtak növekedést az enzim aktivitásában, míg más szerzők megfigyelése szerint nincs szignifikáns változás a kataláz aktivitásban (Fadzilla és mtsai, 1997; Shalata és Tal, 1998).

Glutation-S-transzferáz enzimnél növekvő enzimaktivitást jelentettek 50 mM NaCl kezelés hatására paradicsom kalluszban (Rodríguez-Rosales és mtsai, 1999).

A kép sokszínűsége mutatja, hogy a stresszválaszok áttekintésekor nem egy kiemelt elem, hanem a védekezőrendszer egészének áttekintése, a változások összehasonlító elemzése az, ami közelebb vihet minket e komplex folyamat megértéséhez.

2.5. Nitrogénforrás hatása

A nitrogén, mint ásványi elem nagy mennyiségben szükséges a növények fejlődéséhez. A nitrát és az ammónium ion a növények által leggyakrabban felvett nitrogénforrások. Már régen megfigyelték, hogy az ammónium és nitrát, mint nitrogénforrások különböznek a növények növekedésére és kémiai összetételére gyakorolt hatásukban annak ellenére, hogy a nitrát, amit a növény felvesz a talajból ammóniává redukálódik, mielőtt különböző szintézisutakba csatlakozna (Lewis and Chadwik, 1983; Lips és mtsai, 1990; Cramer és Lewis, 1993).

A különböző környezeti faktorok, mint amilyen a NaCl és különböző nitrogénforrások, együttes alkalmazásának termésre, fotoszintézisre és nitrogén anyagcserére gyakorolt együttes hatását több laboratóriumban vizsgálták (Lewis és mtsai, 1989; Hawkins és Lewis, 1993a,b). A sókezelés nincs jelentős hatással a nitrogén redukciójára és asszimilációjára (Huffaker és Rains, 1986), de a nátrium ionok jelenléte membrán depolarizációhoz vezet, amely nemcsak az ionszelektivitás, hanem az ionfelvétel zavarát is okozhatja (Greenway és Munns, 1980; Cramer és mtsai, 1985; Huffaker és Rains, 1986; Läuchli, 1990). Lewis és mtsai (1989) feltételezték, hogy az ammónián nevelt

növények érzékenyebbek a sóstresszre, mivel az ammónium asszimilációja (mely főleg a gyökérben zajlik) ezen körülmények között lelassul, a növénynek minden energiára szüksége van az ozmoregulációhoz. A témához kapcsolódóan stresszélettani vizsgálatok is folytak. A növények stresszválaszainak kialakításában fontos hormon, az abszcizinsav (Kende és Zeevaart, 1997) mennyisége *Ricinus communis* levelében és gyökerében is megnőtt ammónium táplálás és só stressz hatására, míg a nitrát hatása ezzel ellentétes volt (Peuke és mtsai, 1994).

A gyökér a növénynek az a része, amely elsőként érzékeli a sós környezetet, szárazságot, anoxiát vagy tápanyaghiányt. Éppen ezért az adaptációs folyamatok elsődleges helyét képviseli. A gyökér ideális kísérleti rendszert kínál a NaCl, és különböző tápanyagforrások hatásának vizsgálatára, mivel a gyökérsejtek közvetlenül kitéhetők a stresszhatásnak a tápoldat összetételének változtatásával. Mivel az eltérő gyökérrégiók mind felépítésben, mind pedig működésükben eltérnek egymástól (Zeleneva és mtsai, 1982), a különböző élettani folyamatok érzékenysége az egyes gyökérrégiók válaszreakcióinak elemzésével vizsgálható.

2.6. Napiritmus változásai

A biológiai jelenségekre általánosan jellemző, hogy valamiféle ritmus meghatározható bennük (Hall, 1995; Roenneberg, 1996; Golden és mtsai, 1997). A növények életében a legtöbb élettani és biokémiai folyamatnál megfigyelhetőek ritmikus változások, melyek gyakorisága (periódus) a másodpercektől az évszakos ismétlődésekig terjedhet. Ezen ritmusok a növény fejlődésének kezdetétől, a csírázástól megfigyelhetőek (McClung, 2001). A legjelentősebb ezek közül a változások közül a cirkadián (20 és 28 óra körüli periódus) és az ultradián (cirkadiánnál rövidebb periódus) ritmusok (Erdei és mtsai, 1998).

Néhány példa a növekedésben, fejlődésben és egyéb anyagcserefolyamatokban rejlő ritmusra. *Arabidopsis* esetében vizsgálták a sejt megnyúlásának ritmusát, mely egybeesett az indol-3-ecetsav szintjének változásával (Jouve és mtsai, 1998). Az etilén termelésében is cirkadián ritmust tudtak kimutatni számos fajban (Finlayson és mtsai, 1998; Ievinsh és Kreicbergs, 1992). Fukuda és mtsai (1998) kimutatták, hogy a sztómamozgásban tapasztalható ritmicitás korrelációban van a sztómazárósejtek citoszkelotonjának cirkadián átrendeződésével. A zárósejtek folyamatainak

szabályozásában is résztvevő Ca^{2+} szintjének változását is többen vizsgálták (Leckie és mtsai, 1998; Schroeder és mtsai, 2001), és az eredmények alapján elképzelhető, hogy a Ca^{2+} szerepet játszik az oszcillátor szabályozásához kapcsolódó jelátviteli folyamatokban (McClung, 2001).

Annak ellenére, hogy a legerősebb faktor, mely hatással van a központi ritmusképzőre (pacemaker; Roenneberg (1996) úgy definiálta, mint autoregulatív génexpresszió) a fény, más környezeti faktorok is ismertek, melyek módosíthatják a belső ritmust. Ilyenek lehetnek pl. az alacsony hőmérséklet (Kocsy és mtsai, 1997), fizikai stressz (Koukkari és mtsai, 1997), nitrogénhiány, UV-B sugárzás (Peterson-Mahrt és mtsai, 1994,1995), sóstressz (Herppich és mtsai, 1995), stb. A környezetből származó impulzus két oldalról hathat a ritmusképzőre. Egyrészt annak „bemeneti” oldalán, erre példa a transzkripciós kontroll megvalósulása (Piechulla, 1993), mely megváltozott ritmusú mRNS felhalmozódást idéz elő, és ezzel párhuzamosan változást okoz a kapcsolódó élettani, biokémiai folyamatokban. „Kimeneti” oldalra gyakorolt hatás például az enzimek aktivitásában (a ritmus amplitúdója) hoz változást.

A központi ritmusképzőtől független folyamatok is okozhatnak fluktuációt, ritmikus változást az egyes folyamatokban. Korábban egy membrántranszporton alapuló modellt ajánlottak az oszcillációs folyamatok magyarázatául (Njus és mtsai, 1974). Általánosítani nem lehet, de elmondható, hogy egyes ritmusok kialakulásában, mint például a sztomatogzág, párhuzamosan folyó ionmozgások is jelentős szabályozó szerepet töltenek be (Homblé, 1996).

2.7. Aldehid oxidáz

Több tanulmány részletezi a só és különböző nitrogénforrások hatását Mo-tartalmú enzimekre (Sagi és mtsai, 1998; Omarov és mtsai, 1998; Barabás és mtsai, 2000). Több, mint 30 különféle Mo-tartalmú enzim ismert, melyek közül eddig csak hármat azonosítottak növényekben. Ezek a nitrát reduktáz, aldehid oxidáz és a xantin dehidrogenáz. Ezek az enzimek homodimerek és különböző prosztetikus csoportokkal rendelkezhetnek (FAD, Fe-hem vagy Fe-S) (Mendel és Schwarz, 1999).

Az aldehid oxidáz (AO EC 1.2.3.1.) egy aldehid-oxigén oxidoreduktáz. Első felismerése állati szervezetekben történt, majd izolálták burgonya gumó citoplazmájából (Rothe, 1975). Májban talált magas aktivitása arra utal, hogy szerepet játszik a szennyező

anyagok és xenobiotikumok eltávolításában (Bauer és Howard, 1991). Növényi szervezetben betöltött funkciójáról az utóbbi években egyre több információ került napvilágra. Kimutatták, hogy a növényekben két fontos fitohormon – abszcizinsav (Walker-Simmons és mtsai, 1989; Leydecker és mtsai, 1995; Seo és mtsai, 2000) és indol-3-ecetsav (Koshiba és mtsai, 1996) - bioszintézisének utolsó lépését katalizálja. Mindkét esetben a szintézis egy lehetséges, de nem kizárólagos útját katalizálja. Már ez a két tulajdonság elégséges ahhoz, hogy jelezze, az aldehid oxidázok fontos szerepet játszanak a növények fejlődésében és a környezeti stresszhez való adaptációjában.

Az aldehid oxidáz esetében egész géncsaládról beszélhetünk. Elektroforézissel levél extraktumból *Arabidopsis* (Schwartz és mtsai, 1997) és perje (Sagi és mtsai, 1998) esetében három, míg dohányban 2 izoformát (Akaba és mtsai, 1997) sikerült elkülöníteni. Árpában (Omarov és mtsai, 1999) és kukoricában (Barabás és mtsai, 2000) 4 izoformáját azonosították, mindkét esetben a növény gyökeréből. Kukoricában még azt is kimutatták, hogy az enzim aktivitása a fiatal gyökérrégiókban és a sztélében a legmagasabb (Barabás és mtsai, 2000). Az enzim, mintegy „stresszenzim”-ként működve magasabb enzimaktivitást mutatott sókezelés hatására, ami magyarázható a abszcizinsav szintézisében betöltött szerepével.

Az aldehid oxidázok széles szubsztrátspecifitással rendelkeznek, és ez valószínűsíthetővé teszi, hogy a fitohormon szintézisen kívül más anyagcsere folyamatokban is résztvehetnek. A detoxifikációs folyamatok és a patogénekre adott válaszreakciók lehetnek megfelelő jelöltek, mint további funkciók (Mendel és Schwarz, 1999).

3. KUTATÁSI CÉLOK

Munkánk kezdetén már ismert volt az a tény, hogy a növényi szervezetekben külső tényezők hatására megnő a szabad gyökök és reaktív oxigéntartalmú molekulák koncentrációja. Ezek káros hatásai ellen kiépült egy hatékony antioxidatív védekezőrendszer, mely enzimatisz elemeinek aktivitása változást mutat külső stressztényezők hatására. Így ezek nyomonkövetésével feltárható a növény érzékenysége adott stresszfaktorra, illetve annak növényre gyakorolt hatása. Mivel a sókezelést (NaCl) követően szintén megnő az aktív oxigénszarmazékok koncentrációja (Hernández és mtsai, 1993), lehetőségünk van a sóstressz hatásának vizsgálatára az antioxidáns védekezőrendszer enzimatisz elemein keresztül.

- Több élettani folyamat az élő szervezetekben napi ritmus szerinti változást mutat. A glutation reduktáz enzim aktivitásán keresztül vizsgáltuk, jelen van-e ez a ritmus az enzimatisz védekezőrendszerben.
- Arra is kíváncsiak voltunk, hogy különböző mértékű NaCl kezelez megváltoztatja-e a ritmus jellemzőit.
- Külső környezeti hatások közül a só mellett a különböző nitrogénforrások (nitrát, ammónium) hatását tanulmányoztuk a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, kataláz és glutation-S-transzferáz enzimeken keresztül. Arra kerestünk választ, hogy miként hatnak ezek a tényezők a védekezőrendszer aktivitására, illetve egymásra. Erősítik, vagy gyengítik egymás hatását. Ezek megválaszolásához vizsgáltuk az enzimek aktivitásának változását, illetve izoenzimeik jelenlétét különböző körülmények között nevelt növényekben.
- Az aldehid oxidáz enzim, bár nem antioxidáns, az utóbbi években bekerült a stresszhatásokkal foglalkozó tanulmányok körébe. Ennek magyarázatául szolgál, hogy napjainkban mind több, stresszválaszhoz köthető funkcióját tárták fel. Mivel folyamatosan újabb és újabb információk jelennek meg az enzimmel kapcsolatban, sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk, annak reményében, hogy sikerül az enzimet azonosítanunk kukorica gyökér mitokondriumban vagy peroxiszómában.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Növénynevelés, mintavétel

1. kísérlet: hatvanórás vizsgálat a napiritmus meghatározásához

Vizsgálatainkhoz a *Triticum aestivum* L. cv. GK Katát, egy csökkent vízpotenciálra érzékenyebb búzafajtát használtunk, amit a szegedi Gabonatermesztési Kutató KHT bocsátott a rendelkezésünkre. A magokat desztillált vízzel átnedvesített szűrőpapíron csíráztattuk három napig szobahőmérsékleten, majd fitotronban (Convion Type PGV 36) vízkultúrában neveltük tovább. A tápoldat összetételét a 3. és 4. táblázat mutatja. A napi megvilágítás 12 óra (8:30-20:30), a hőmérséklet 23/18 °C (nappal/éjszaka) volt. A kísérlet során két alkalommal, az 5. és 10. napon cseréltünk tápoldatot. A 12. nap reggel 7 órakor kezdtük meg a sókezelést, a növényeket 0 (kontroll), 50, 100, 150 mM NaCl-ot tartalmazó tápoldatban neveltük. (Az ekkor vett mintákat tekintjük nulla idősnak.) A mintavétel ezek után hatvan órán keresztül folyamatosan, óránként zajlott. Minden alkalommal a különböző körülmények között tartott növényekből levél és gyökér mintát is vettünk. A lemerített, becsomagolt minták minden esetben először folyékony nitrogénbe, majd feldolgozásig –80 °C-os hűtőbe kerültek.

2. kísérlet: só és különböző nitrogénforrás hatásának vizsgálata

A vizsgálatainkban szereplő növények a következők: *Helianthus annuum* L. cv. Jerusalem Gold napraforgó és *Zea mays* L. cv. Jubilee kukorica fajták forrása Izrael; az Mv Emma, Mv Martina és Mv Mezőföld búzafajtákat a martonvásári Mezőgazdasági Kutatóintézet bocsátotta rendelkezésünkre.

A magokat desztillált vízzel átnedvesített szűrőpapíron csíráztattuk három napig, majd üvegházi körülmények között, vízkultúrában neveltük tovább. A nappali megvilágítás hossza 12-16 óra között változott, a hőmérséklet pedig 23-30/10-18 °C nappal/ éjszaka, kísérlettől függően. A tápoldat összetétele megegyezett az első kísérletben leírtakkal, kivéve a nitrogénforrást. Ez lehetett NaNO₃, (NH₄)₂SO₄ vagy NH₄NO₃, kísérlettől függően, 4 mM N-koncentrációban. A növények rögtön az adott nitrogénforrást tartalmazó oldatba kerültek, majd a sókezelés a 3. napon, az első tápoldatcsere alkalmával kezdődött,

50 ill. 100 mM NaCl-al, kísérlettől függően. A mintavétel a kezelés kezdetétől számított 1., 2. vagy 3. héten történt, mind a levélből, mind pedig gyökérből. A lemért, becsomagolt minták minden esetben először folyékony nitrogénbe, majd feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hűtőbe kerültek.

A kukoricával végzett kísérletek kiegészültek a különböző gyökérrégiók vizsgálatával. Ezt a növény erősebb gyökérszete tette lehetővé. 12-14 cm-es gyökereket gyűjtöttünk, és jégre helyezett üveglapon vágtuk őket a következő darabokra: 0-10, 0-1, 1-2, 2-10, a számok a gyökércsúcsától mért távolságot jelentik cm-ben. A 2-10 cm-es darabok egy részében elkülönítettük a gyökér cortex és sztele állományát. A lemért, becsomagolt minták minden esetben először folyékony nitrogénbe, majd feldolgozásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hűtőbe kerültek.

3. táblázat: A tápoldat makroelem összetétele.

		Kontroll	50 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
Ionkoncentráció	K^+	2	2	2	2
	Na^+	-	50	100	150
	Mg^{2+}	2	2	2	2
	Ca^{2+}	2	2	2	2
	Cl^-	-	50	100	150
	SO_4^{2-}	2	2	2	2
	NO_3^-	4	4	4	4
	HPO_4^{2-}	0,5	0,5	0,5	0,5

4. táblázat: A tápoldat mikroelem összetétele.

Mikroelem	Vegyület	Koncentráció (mM)
Fe	Fe-EDTA	10
B	H_3BO_3	10
Mn	MnSO_4	1
Zn	ZnSO_4	0,5
Cu	CuSO_4	0,5
Mo	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	0,1
Co	CoCl_2	0,1
Al	AlCl_3	0,1
Si	Na_2SiO_3	0,5

4.2. Mintaelőkészítés enzimaktivitás méréséhez

Az előkészítés során a mintákat 4 °C-on tartottuk. A növényi mintát először kisebb darabokra vágtuk, majd porcelán mozsárban 1% (m/V) PVPP és 1:4 arányban hozzáadott 50 mM foszfát puffer (pH = 7,0; 1 mM EDTA) segítségével eldörzsöltük. Az így kapott homogenizátumot (4 °C, 15000 rpm, 20 perc) centrifugáltuk.

A felülúszót Eppendorf csövekbe szétosztottuk, és mérésig –20 °C-os hűtőben tároltuk. Az így előkészített mintákból az általunk vizsgált enzimek aktivitása meghatározható volt, és az extraktum az izoforma vizsgálatokhoz is megfelelt.

4.3. Enzimaktivitás meghatározása

Az enzimaktivitások meghatározása fotometriás úton történt (Schimadzu UV-VIS 160A). A fagyasztóból kivett mintákat jégen tartottuk, a méréseket szobahőmérsékleten végeztük.

Kataláz (EC 1.11.1.6) aktivitásának meghatározásához a reakciókeverék 46 mM kálium foszfát puffert (pH = 7,0), 0,03% H₂O₂-ot és enzim extraktumot tartalmazott. A H₂O₂ bomlását követtük nyomon 240 nm-en (1 EU = 1 μmol lebomlott H₂O₂ 1 perc alatt) (Upadhyaya és mtsai, 1985).

Guajakol peroxidáz (EC 1.11.1.7) aktivitásának meghatározásakor a guajakol oxidációjából származó abszorbancia növekedést követtük nyomon 470 nm-en (EU = 1 μmol oxidált guajakol 1 perc alatt). A reakciókeverék az enzim mellett 32 mM kálium foszfát puffert (pH = 7,0), 0,1% H₂O₂-ot, 0,25% guajakolt tartalmazott (Upadhyaya és mtsai, 1985).

Glutation reduktáz (EC 1.6.4.2) aktivitásának meghatározására Smith és munkatársai (1988) által kidolgozott módszert használtuk. A DTNB redukcióját követtük nyomon 412 nm-en, amit a GSSG-ből az enzimaktivitásnak köszönhetően keletkezett GSH okozott. A reakcióelegy összetétele: 0,1 M foszfát puffer (pH = 7,5), 1 mM EDTA, 0,75 mM DTNB, 0,1 mM NADPH, 1 mM GSSG és minta. 1 EU az az enzimmennyiség, amely 1 μmol oxidált glutationt redukál egy perc alatt.

Szuperoxid dizmutáz (EC 1.15.1.1) aktivitás meghatározása Beauchamp és Fridovich (1971) módszerével történt. A reakció a NBT redukció gátlásán alapul riboflavin

jelenlétében, megvilágításkor. 1 egység az az enzimmennyiség, amely a redukció 50%-os gátlásához szükséges. A kémcsövek 45 mM kálium foszfát puffert (pH = 7,0), 0,1 mM EDTA-t, 13 mM metionint, 0,17 mM NBT-t (etanolban oldva), 0,007 mM riboflavint és enzimkivonatot tartalmaztak. A kontrollt sötétben tartottuk, míg a többi mintát megvilágítottuk 15 percig világítóasztalon. A minták fényelnyelését 560 nm-en mértük.

Glutation-S-transzferáz (EC 2.5.1.18) aktivitásának meghatározásához a következő összetételű elegyet használtuk: 0,17 mM nátrium foszfát puffer (pH = 6,5), 1 mM GSH, 1 mM CDNB (alkoholban oldva) és a minta. 340 nm-en követtük az abszorbancia változását. 1 EU egyenlő azzal az enzimmennyiséggel, amely katalizálja 1 μ mol S-2,4-dinitrofenilglutation képződését 1 perc alatt (Mannervik és Guthenberg, 1981).

Az összfehérje mennyiségét Bradford (1976) módosított módszerén alapuló Bio-Rad eljárással és reagenssel határoztuk meg. A reakcióelegy abszorbanciáját 595 nm-en mértük.

4.4. Poliakrilamid gélelektroforézis (PAGE)

Az 4.2. pontban leírtak alapján feltárt minták fehérjéinek elválasztását nem denaturáló (natív) PAGE-n végeztük. A gyűjtő gél (akrilamid koncentráció (T) = 3,125%, bisz-akrilamid koncentráció (C) = 20%) 39,5 mM Tris- H_3PO_4 puffert (pH = 6,9) tartalmazott. Az elválasztó gél (T = 7 vagy 10%, C = 5%) 0,24 M Tris-HCl pufferrel (pH = 8,48) készült. A mintáinkhoz a futtatás előtt 1:10 arányban festékoldatot adtunk, melynek összetétele 50% szacharóz és 0,1% brómfenolkék volt. A gyűjtőgél zsebeibe az egyes futtatásoknál a különböző mintákból azonos fehérjemennyiséget (45 μ g) vittünk fel. Nem folyamatos pufferrendszerrel dolgoztunk. Alsó tank puffer összetétele 63 mM Tris-HCl (pH = 7,47), míg a felső tank puffer összetétele: 376 mM Tris, 40 mM glicin (pH = 8,89) volt. A gélek 20 mA/gél folyamatos áramerősség mellett kb. 5 óra hosszat futottak a GR, SOD, Kat és AO enzimek esetében, míg a GPx enzim esetében 16 órát. A futtatás során állandó hőmérsékletet (5 °C) tartottunk.

4.5. Festési eljárások, enzimaktivitás meghatározása gélben

Glutation reduktáz enzim izoformáinak meghatározásához a gél a következőkben leírt oldatban inkubáltuk 25 percig sötétben. Az oldat összetétele: 25 mM Tris-HCl puffer (pH = 7,6), 3,4 mM GSSG, 0,4 mM NADPH, 1,2 mM MTT, 0,04 mM DCIP (Anderson és mtsai, 1992). A fehér háttérben megjelenő kékes sávok jelölték az enzimaktivitást. A GSSG-független aktivitás elkülönítése érdekében párhuzamosan 2 gél futtattunk, és az ismétlés GSSG-t nem tartalmazó oldatba került.

A *szuperoxid dizmutáz* gélben történő meghatározásához Beauchamp és Fridovich (1971) módszerét használtuk. 0,24 mM NBT-t tartalmazó 50 mM Na-foszfát pufferben (pH = 7,8) inkubáltuk a gél 20 percig sötétben, majd mosást követően 50 mM Na-foszfát puffer (pH = 7,8), 28 μ M riboflavin, 28 mM TEMED összetételű oldatban enyhén ráztunk 15 percig. Ezek után a gél világitóasztalra helyeztük, és 15 perc megvilágítás után láthatóvá váltak a fehér sávok lilás háttérben. Az enzimnek több izoformája ismert, melyek a KCN-ra, illetve H_2O_2 -ra való érzékenységük alapján különíthetők el (5. táblázat). A Cu/Zn SOD KCN-ra és H_2O_2 -ra is érzékeny, míg a Fe SOD aktivitását csak a H_2O_2 gátolja. A Mn SOD nem érzékeny egyik vegyületre sem. A H_2O_2 gátló hatásának vizsgálatához festés előtt a gél előinkubáltuk 50 mM Na-foszfát (pH = 7,8), 0,5 mM EDTA, 3 mM H_2O_2 összetételű oldatban. A KCN vizsgálata esetén az első inkubáló oldat az NBT mellett 2 mM KCN-ot is tartalmazott.

5.táblázat: A szuperoxid dizmutáz enzimek elkülönítése a KCN-ra illetve H_2O_2 -ra való érzékenységük alapján. + jellel a gátló hatást jelöltük.

	KCN	H_2O_2
Cu/Zn SOD	+	+
Fe SOD	-	+
Mn SOD	-	-

A *kataláz* meghatározásához először 0,003% (v/v) H_2O_2 oldatban inkubáltuk a gél 15 percig, majd mosás után az izoformákat 1%-os $FeCl_3$ és 1%-os $K_3Fe(CN)_6$ oldatok felhasználásával detektáltuk (Woodbury és mtsai, 1971). Az izoformákat a sötétkék háttérben megjelenő világos sávok jelölték.

Guajakol peroxidáz kimutatásához Fieldes (1992) módszerét használtuk. A gél a festő elegyben (50 ml 10 mM H_2O_2 , 75 ml 20 mM guajakol, 75 ml 0,1 M Tris-HCl puffer (pH =

4)) 10 percig inkubáltuk, majd Coomassie fixálóban (1% ecetsav, 24% metanol és 0,018 mg/ml Coomassie Blue R-250) rögzítettük a sávokat 16 órán keresztül. Világos háttérben barnás sávokként jelentkeztek az izoformák.

Az *aldehid oxidáz* enzim aktivitásának meghatározásához a gélünket egy éjszakán át inkubáltuk a 0,1 M Tris-HCl (pH = 7,5), 0,1 mM PMS, 1 mM MTT, 1 mM I-3-A összetételű reakcióelegyben (Barabás és mtsai, 2000). Sárgás háttérben megjelenő sötétkek sávok jelölték az enzimaktivitást.

Az elkészült géleket lefotóztuk, majd benedvesített háztartási celofánrétegek között, üveglapra feszítve szobahőmérsékleten megszáritottuk.

4.6. Sejtalkotók preparálása

A munkát folyamatosan jégen végeztük, hűtött oldatokat használtunk. 60 g kukorica gyökeret mixerben 300 ml extraháló oldatban felaprítottunk, majd gézen átszűrtünk. Az extrakciós puffer összetétele: 20 mM HEPES (pH = 7,5), 20 mM AA, 5 mM ϵ -amino-N-kapronsav, 10 mM β -merkaptoetanol, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,4 M szacharóz, 0,3% BSA, 1% PVP.

A szűrletet 4 °C-on 1500 rpm 5 percig centrifugáltuk, majd a felülúszót tovább centrifugáltuk (4 °C, 8500 rpm, 5 perc). Minden lépésnél a felülúszóból ellenőrzés céljából félretettünk 0,5 ml-t.

Az üledéket minimális mennyiségű reszuszpendáló oldatban (10 mM HEPES (pH = 7,5), 1 mM AA, 10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,4 M szacharóz) óvatosan, ecsettel újra feloldottuk. Az így kapott oldat mitokondriumot, peroxiszómát és törött sejtalkotókat tartalmazott. Ebből 1 ml-t rétegeztünk 10 ml-es gradiens oszlopra. A lineáris gradiens oszlop 25-57%-os szacharóz oldat (10 mM Tricine pH = 7,5, 1 mM EDTA) felhasználásával készült.

A grádienseket ultracentrifugában centrifugáltuk SW 41 típusú kilendülő fejes rotorban (4 °C, 20000 rpm, 3 óra 30 perc).

A centrifugálást követően a centrifugacső aljáról indulva, üvegapilláris segítségével 0,5 ml frakciókat gyűjtöttünk, melyekben meghatároztuk a kataláz valamint a citokróm-oxidáz enzimek aktivitását. A kataláz aktivitását a 4.5. pontban már leírtak alapján határoztuk meg.

Citokróm-oxidáz aktivitásának meghatározása fotometriás úton történt 800 µl mérőpuffer és 50 µl minta összekeverése után 550 nm-en követtük a változásokat. 20 ml mérőpuffer összetétele: 18,75 ml 40 mM Na₃PO₄ (pH = 6,0), 0,25 ml 20% Triton 100, 2 ml redukált citokróm C.

A kiválasztott frakciók további felhasználásig –20 °C-os hűtőbe kerültek.

A megfelelő mennyiségű anyag összegyűjtése után a frakciókat cukormentesítettük Sigma Sephadex G-25 oszlopon, és a mintákat Millipore Ultrafree-CL centrifuga filterrel koncentráltuk.

Az AO enzim aktivitásának meghatározása poliakrilamid gélben a 4.5.-ban leírtak szerint történt.

4.7. Matematikai analízis

Fourier-transzformáció

A különböző periódusok kiszámításához (1. kísérleti rendszer) Fourier transzformációt használtunk a MATLAB 4.0 programozási környezetbe ágyazott radix-2 fast Fourier transzformációs algoritmus segítségével.

Szignifikancia vizsgálat

A szignifikáns különbségek meghatározásához Student féle kétmintás t-próbát használtunk. Mintaszám 3-6 kísérlettől függően. A statisztikai elemzéseket a STATISTICA 5.0 program segítségével végeztük.

5. EREDMÉNYEK

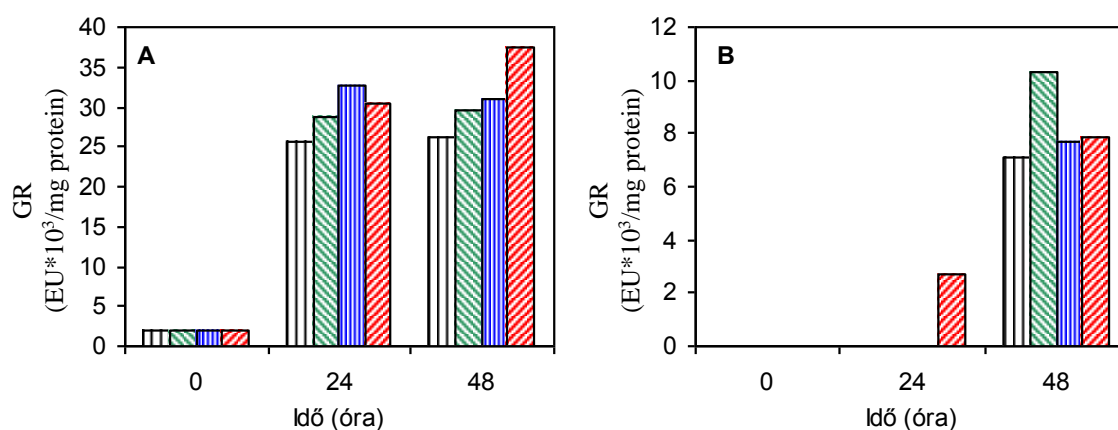
5.1. *A glutation reduktáz aktivitásának vizsgálata időben, különböző mértékű sókezelés (NaCl) mellett*

Az első kísérleti rendszerünkben a glutation reduktáz enzim aktivitásának változását vizsgáltuk különböző sókezelések (50, 100, 150 mM NaCl) esetén. A mintavétel a kezelés megkezdésétől óránként, hatvan órán keresztül történt. Ezt a kísérletet fitotroni körülmények között állítottuk be. A megvilágítás időtartama napi 12 óra volt, 8:30-tól 20:30-ig. Ez a kísérleti rendszer többértékű információt hordoz. Vizsgálható a kapott eredményekből az enzim aktivitásának változása mind időben, mind pedig különböző sókoncentrációk okozta stressz hatására. A glutation reduktáz enzim aktivitásában időbeli változást tapasztaltunk, valamint eltérő választ a különböző sókezelésekre. Először tekintsük át a különböző sókoncentrációk enzimaktivitásra gyakorolt hatását.

5.1.1. *Glutation reduktáz aktivitásának változása különböző sókoncentrációk esetén*

A sókezelés hatásának könnyebb áttekinthetőségéhez kiemeltük a 24 és 48 órás kezelést, és összehasonlítottuk a kiindulási értékekkel (3. ábra). Az enzim aktivitása eltér a levélben és a gyökérben (3.A és 3.B ábra). A kezdeti (0 időpillanat) enzimaktivitás alacsony a levélben, míg gyökérben a detektálási határ alatt van. Az enzimaktivitás növekedése nagyobb mértékű a levélben, mint a gyökérben. Míg levélben 13-18-szoros a növekedés, addig ennek mértéke 3-5-szörös a gyökérben. Az 3. ábra mutatja, hogy a levélben a nagyobb mértékű enzimaktivitás növekedés az első 24 órában lezajlik (10-13-szoros). A második 24 órában lényeges változást csak a 150 mM NaCl kezelés vált ki. Ahogy azt a 3.A és 4.A ábrák mutatják, a nagyobb sókoncentráció alkalmazása nem vált ki arányosan magasabb enzimaktivitást. Általánosan elmondható, hogy sókezelés a GR enzim aktivitását megnövelte.

A 3.B és 4.B ábrán a változásokat a gyökérben követhetjük nyomon. Az eredmények hasonlóak a levélben tapasztaltakhoz, azt a különbséget kiemelve, hogy jelentősebb mértékű enzimaktivitás változás a gyökér esetében a második 24 órában következett be. Az első 24 órában változást csak a 150 mM NaCl kezelésnél láttunk.

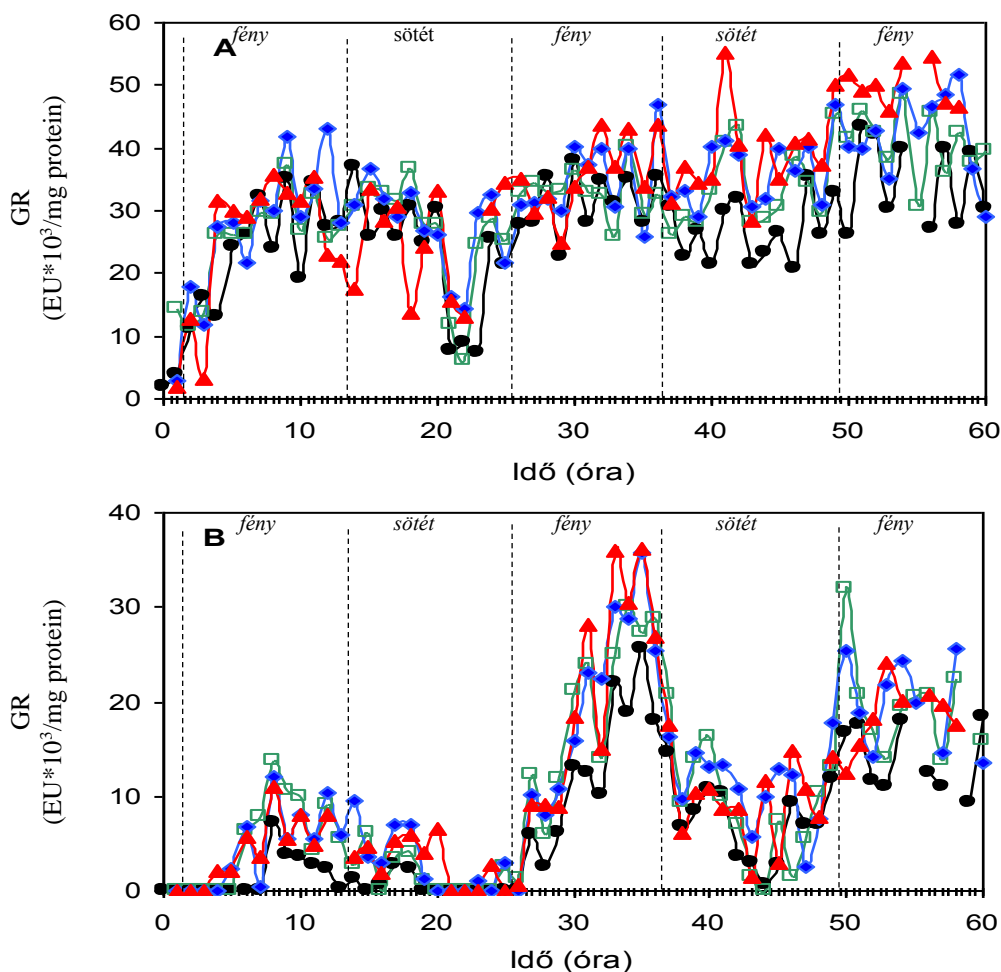


3. ábra: A glutation reduktáz enzim aktivitásának változása kontroll és sókezelt búza levélben (A) és gyökérben (B), a kezelés megkezdésekor, majd 24 és 48 óra elteltével. Jelölések: kontroll, 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl kezelés. A szórás értéke < 5%. Gyökérben a kontroll, és a 24 órán át kezelt növényekben – a NaCl-ot kivéve – enzimaktivitás nem volt kimutatható.

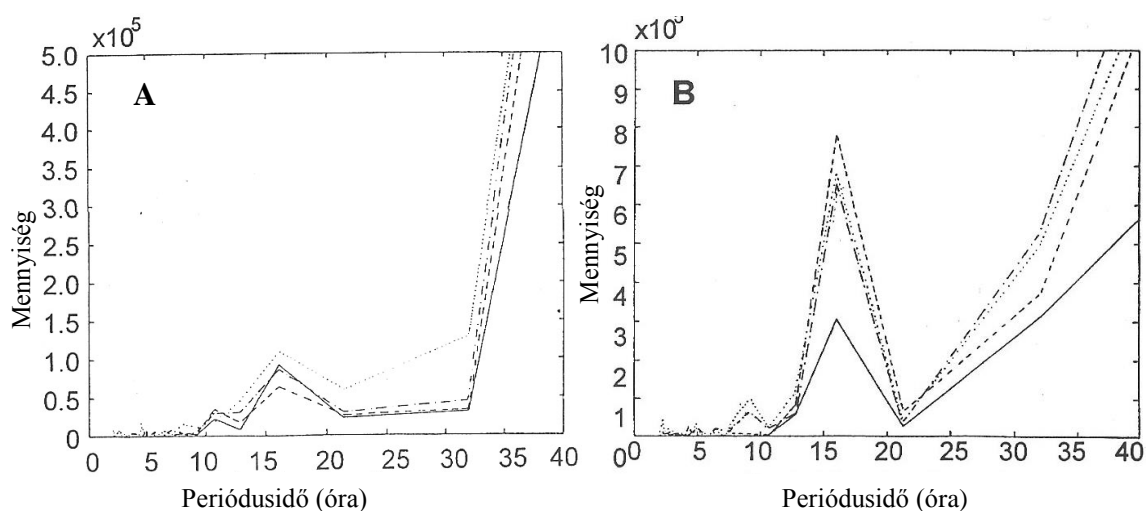
A 48 órás kezelés után kiemelkedik az 50 mM NaCl hatása, de a 4.B ábrán is látható, nincs korreláció a detektálható enzimaktivitás és a kezelés nagysága között.

5.1.2. Glutation reduktáz enzim aktivitásának időbeli változása

A különböző sókoncentrációknál mért enzimaktivitások párhuzamosan változnak. Az enzim aktivitása nő, majd csökken időben, de nem tér vissza a kiindulási értékre (4. ábra). A ritmus 20 óra körüli, és azonos fázisban van a kontroll és a kezelt növényekben is. Az aktivitások mélypontja mind a levél, mind pedig a gyökér esetében a sötét szakasz vége előtt volt, az aktivitás még a fény bekapcsolása előtt növekedni kezdett. Ez azt mutatja, hogy ebben az esetben a fázisváltásokat más faktor, nem pedig a fény/sötét váltakozása irányítja. A periódusidő pontosabb meghatározásához az idő-enzimaktivitás görbék Fourier transzformációját végeztük el (5. ábra).



4. ábra: A glutation reduktáz enzim aktivitásának időbeli változása búza levélben (A) és gyökérben (B), különböző sókoncentráció mellett nevelt növények esetében. Jelölések: kontroll, 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl kezelés. A szaggatott vonal a 12 órás fény/sötét szakaszok határát jelöli. A szórás értéke < 5%.



5. ábra: A 4. ábra adataiból végzett Fourier transzformáció eredménye. Az ábrán használt jelölések: A: levél, B: gyökér, — kontroll, ---- 50 mM NaCl, 100 mM NaCl, - · - · - 150 mM NaCl.

A Fourier transzformáció lényegében az egyes kezelések által meghatározott hullámokat összetevőire bontja, és összegzi őket periódusidejük alapján. Egy 15 és 20 óra közötti ritmus megfigyelhető mind a levélben, mind pedig a gyökérben. A csúcs azonos helyen van a kontroll és a kezelt növényekben. Egy rövidebb periódusidejű (ultradián) ritmus is jól elkülöníthetően kiemelkedik a háttérből. E ritmus periódusideje 10-óránál kisebb gyökér esetében, míg 10-óránál alig nagyobb értéket vesz fel a levélben. 150 mM NaCl kezelés esetében eltűnt ez a csúcs levélben, míg gyökér esetében 100 és 150 mM NaCl kezelés indukálja e rövidebb periódusidejű ritmus megjelenését. Gyökérben a Fourier transzformáció is jól mutatja az amplitúdó jelentős növekedését sókezelés hatására.

5.2. Nitrogén és NaCl együttes hatásának vizsgálata kukorica és napraforgó növényekben

5.2.1. Különböző nitrogénforrás (NH_4^+ , NO_3^-) antioxidáns enzimekre gyakorolt hatása

Mivel korábbi ismeretekkel nem rendelkezünk a nitrogénforrás antioxidáns enzimekre gyakorolt hatásáról, ezért egy kisebb léptékű (sókezelés nélküli) előkísérletben vizsgáltuk a különböző nitrogénforrások hatását 1, 2 illetve 3 hetes növényekben (6. ábra).

Látható, hogy az enzimek aktivitása a kataláz és napraforgóban a glutation reduktáz kivételével magasabb volt gyökérben, mint levélben. Megfigyelhető, hogy az enzimek aktivitása eltér a különböző nitrogénforráson nevelt növényekben. Az ammóniumkezelés hatását tekintve azonosságokat és különbségeket is lehet találni a két faj között.

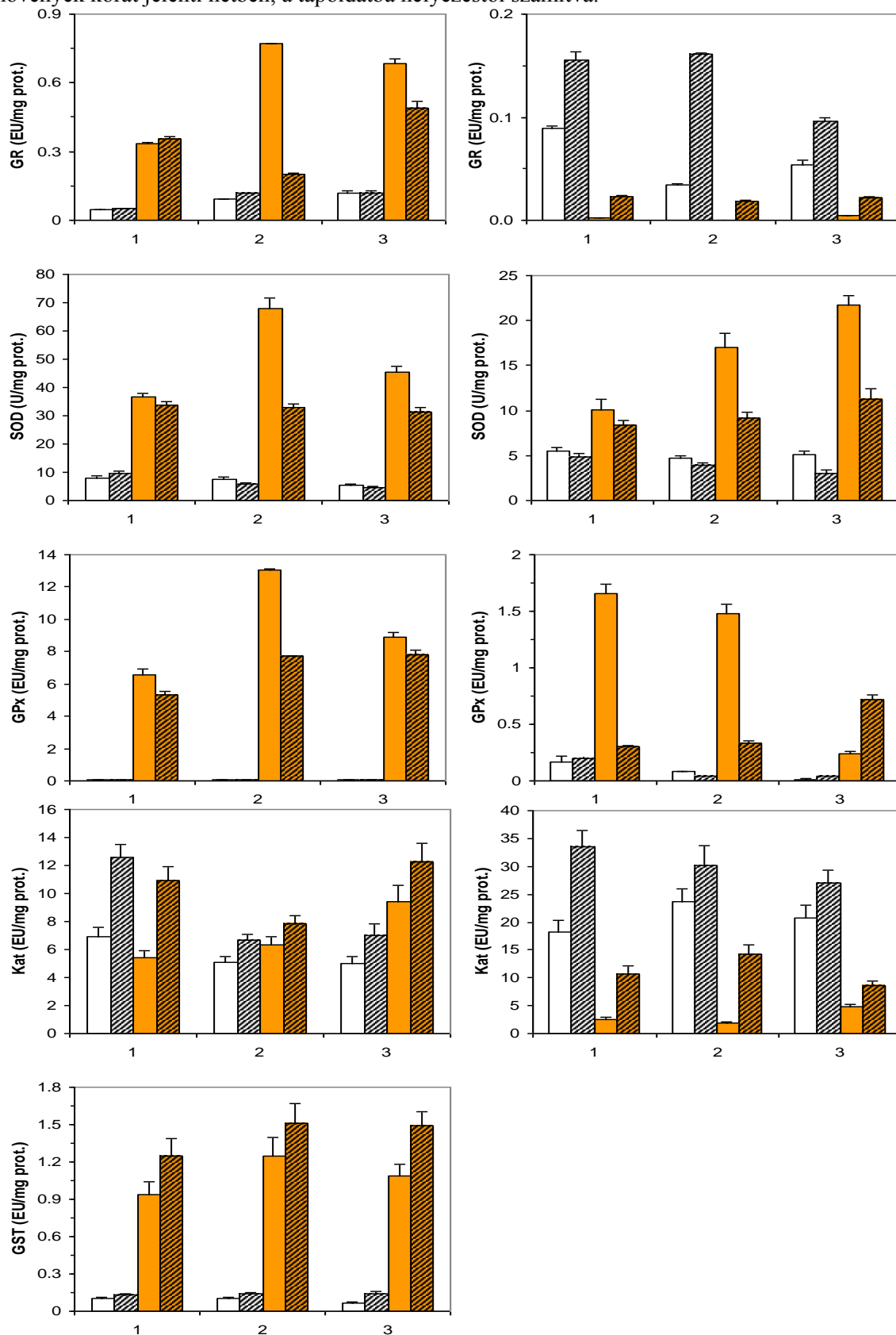
A glutation reduktáz esetében a kukorica levelében nem volt különbség, míg a gyökérben ammónium táplálással csökkent az enzim aktivitása. Ezzel szemben napraforgóban mind a levélben, mind pedig a gyökérben az ammóniumkezelés hozott magasabb enzimaktivitást. A levélmintákban nem találtunk szignifikáns különbséget a szuperoxid dizmutáz aktivitásban, míg gyökérben ammóniumkezelés esetén alacsonyabb volt az enzim aktivitása.

Guajakol peroxidáz esetében hasonló megfigyeléseket tehetünk, ez alól kivétel a napraforgó gyökér, ahol az enzimaktivitás növekedést mutatott az ammóniumon nevelt növények esetében.

A kataláz aktivitás magasabb volt azokban a növényekben, amelyek ammóniumot használtak nitrogénforrásként. Ezt figyeltük meg mindkét faj esetében már a kezelés első hetében.

A Glutation-S-transzferáz esetében az enzim aktivitását csak a kukoricában tudtuk értékelni, mivel napraforgó esetében az enzim aktivitása a detektálási határ alatt volt. A glutation-S-transzferáz enzim esetében is enzimaktivitás növekedést figyelhattunk meg ammóniumon nevelt növényekben, összehasonlítva azokkal, melyek nitrátot tartalmazó tápoldatban nőttek.

6. ábra: Az antioxidáns enzimek aktivitásának változása különböző nitrogénforráson (NO_3^- , NH_4^+) nevelt kukorica (bal oldali ábrák) és napraforgó (jobb oldali ábrák) növények levelében (fehér oszlop) és gyökerében (narancssárga oszlop). Sávozás az ammóniumkezelést jelöli. 1, 2, 3 a növények korát jelenti hétben, a tápoldatba helyezéstől számítva.



5.2.2. A különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és sókezelt (100 mM NaCl) kukorica és napraforgó növények biomassza produkciója

Az előkísérletben kapott eredmények jelezték, hogy az antioxidáns enzimek érzékenyen reagálnak a nitrogénforrás milyenségére, és az eredmények alapján a továbbiakban kéthetes növényeket használtunk. A kísérletben mind a nitráton, mind pedig az ammóniumon nevelt növények esetében a kontroll mellett 100 mM NaCl kezelést is alkalmaztunk.

A különböző tápanyagforráson nevelt növények friss- és száraztömeg adatai a 6. táblázatban találhatók. Mind a kukorica, mind a napraforgó esetében azt tapasztaltuk, hogy a növekedés kisebb volt, amikor nitrogénforrásként ammónium volt a tápoldatban. A sókezelt növények nedvességtartalma alacsonyabb volt, mint a kontroll növényeké. A sókezelés nagyobb mértékben gátolta a levelek növekedését, mint a gyökereket, ami megfelel annak a ténynek, hogy környezeti stressz hatásának kitett növények esetében csökken a hajtás/gyökér arány (Hawkins és Lewis, 1993a).

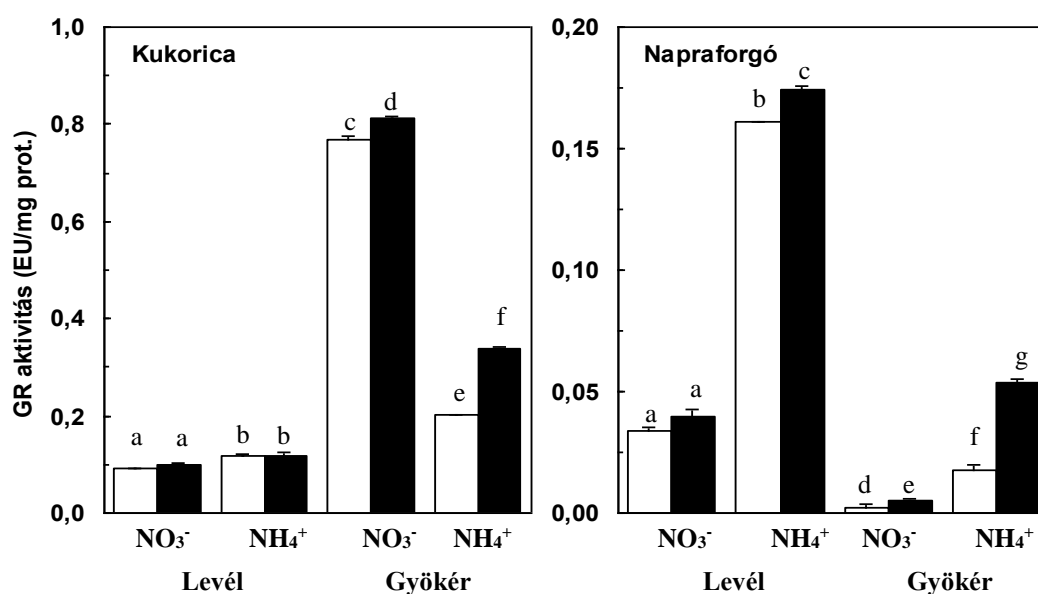
6. táblázat: A sókezelés (100 mM NaCl) hatása a különböző nitrogénforráson (NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4mM N) nevelt kukorica (K) és napraforgó (N) növények növekedésére, a kezelés megkezdése után 2 héttel. I: a sókezelés okozta súlycsökkenés a kontroll %-ában kifejezve.

Minta	Levél tömeg (g)		Gyökér tömeg (g)		Nedvesség tartalom (%)	
	FW	DW	FW	DW	L	Gy
Nitráton nevelt növények						
<u>Kukorica</u>						
kontroll	22.24 ± 1.99	2.26 ± 0.33	8.81 ± 1.00	0.50 ± 0.05	89.8	94.3
kezelt	4.35 ± 0.92	0.55 ± 0.08	3.35 ± 0.41	0.26 ± 0.01	87.3	92.2
I (%)	80	76	62	48		
<u>Napraforgó</u>						
kontroll	15.40 ± 0.28	1.71 ± 0.12	5.96 ± 0.08	0.23 ± 0.03	88.9	96.2
kezelt	8.45 ± 0.64	0.95 ± 0.09	4.24 ± 0.37	0.21 ± 0.02	88.8	95.1
I (%)	45	44	29	8		
Ammóniumon nevelt növények						
<u>Kukorica</u>						
kontroll	17.37 ± 3.35	1.77 ± 0.21	8.47 ± 0.64	0.35 ± 0.03	89.8	95.9
kezelt	4.35 ± 0.95	0.52 ± 0.06	3.07 ± 0.59	0.17 ± 0.01	87.9	94.4
I (%)	75	71	64	51		
<u>Napraforgó</u>						
kontroll	14.78 ± 1.53	1.52 ± 0.03	4.81 ± 0.54	0.16 ± 0.02	89.7	96.8
kezelt	7.45 ± 0.24	0.92 ± 0.12	2.89 ± 0.47	0.12 ± 0.01	87.6	96.0
I (%)	50	39	40	25		

5.2.3. Antioxidáns enzimek aktivitásának változása sókezelés (100 mM NaCl) hatására különböző nitrogénforráson nevelt növények esetében

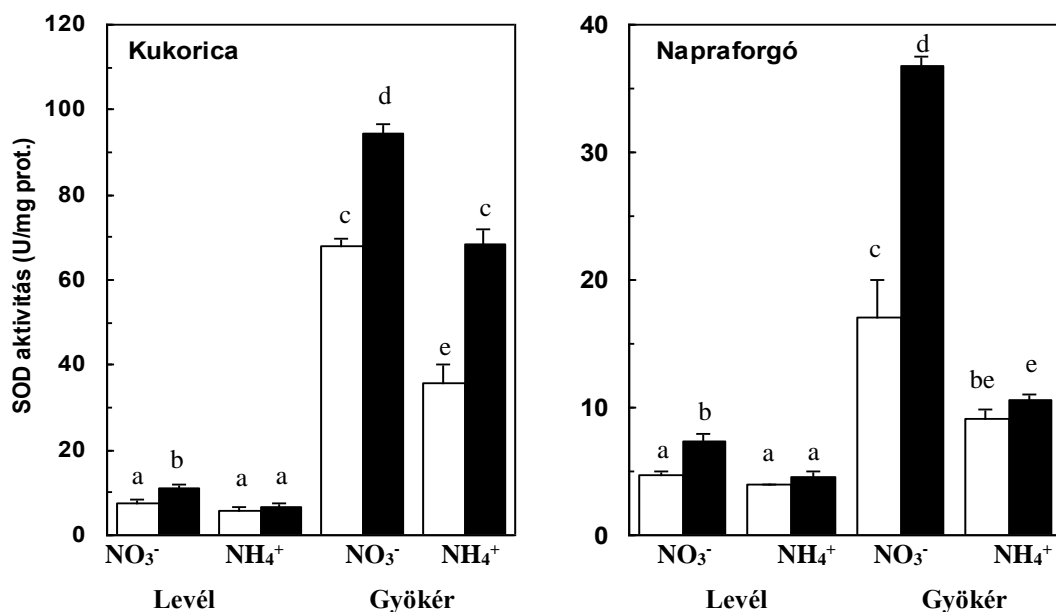
Az antioxidáns enzimek aktivitásuk megváltozásával reagálnak a megváltozott körülményekre. Jelen vizsgálatunkban a GR, SOD, GPx, Kat és GST enzimek aktivitását vizsgáltuk kontroll és 100 mM NaCl-al kezelt kukorica és napraforgó növényekben. A tápoldatba nitrogénforrásként NO_3^- -t vagy NH_4^+ -t adagoltunk.

A só hatása a GR aktivitására hasonló volt a két fajban (7. ábra). A sókezelés hatására a GR enzim aktivitása megnőtt, bár szignifikáns különbségeket csak a gyökér esetében tudtunk kimutatni. Az ammóniummal táplált növények aktivitása magasabb volt napraforgóban és kukorica levélben, míg a kukorica gyökérben a nitráton nevelt növények mutattak magasabb aktivitást.



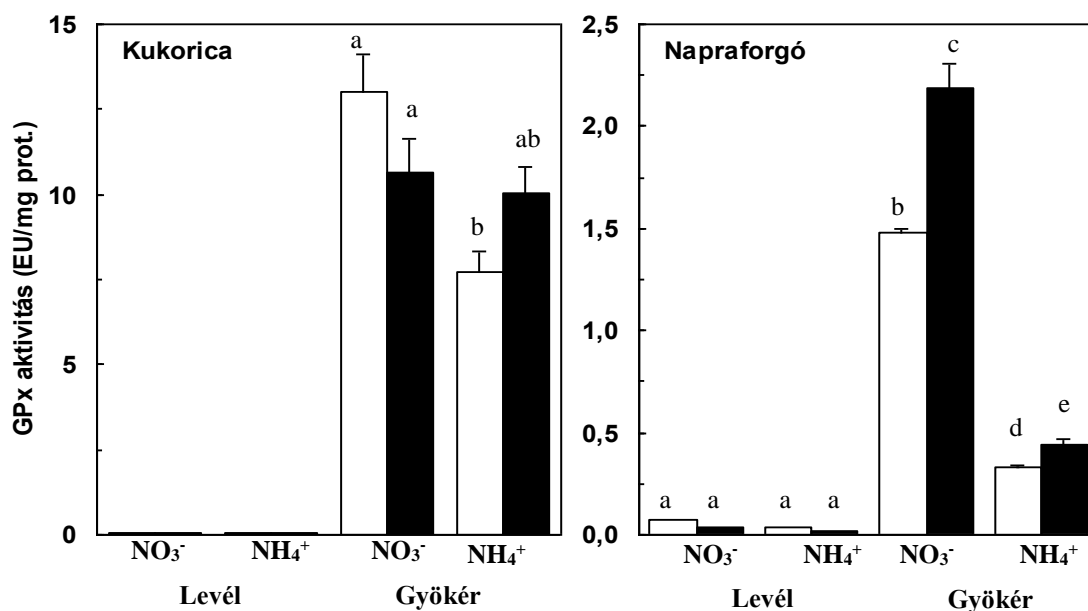
7. ábra: A GR enzim aktivitásának változása sókezelés hatására a különböző nitrogénforráson nevelt kukorica és napraforgó növényekben. Üres oszlop jelöli a kontroll, kitöltött oszlop a kezelt (100 mM NaCl) növényeket. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek ($P = 5\%$, $n = 3$).

A sókezelt növények magasabb SOD aktivitást mutattak mind a napraforgó, mind a kukorica növényekben (8. ábra). A levelekben nem volt szignifikáns különbség a nitrát és ammónium táplált növények között, míg gyökérben szignifikánsan magasabb aktivitást találtunk azoknál a növényeknél, ahol nitrát szolgált nitrogénforrásként. Jelentősen magasabb enzimaktivitást találtunk gyökérben. Az eredmények azonosak voltak mindkét faj esetében.



8. ábra: A SOD enzim aktivitásának változása sókezelés hatására a különböző nitrogénforráson nevelt kukorica és napraforgó növényekben. Üres oszlop jelöli a kontroll, kitöltött oszlop a kezelt (100 mM NaCl) növényeket. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek ($P = 5\%$, $n = 3$).

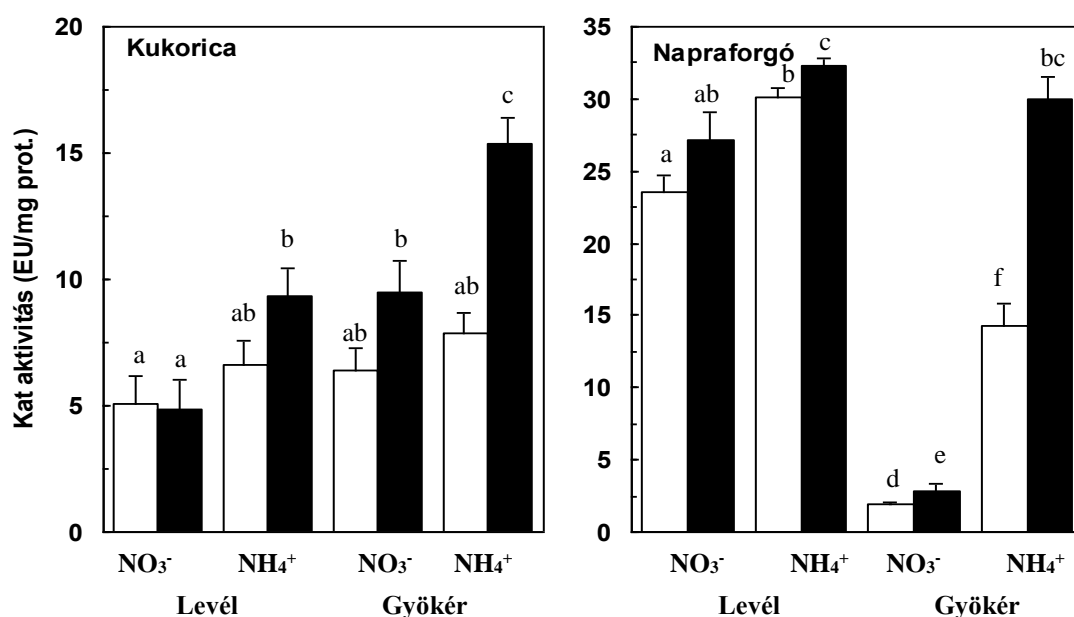
A növények gyökerében magasabb GPx aktivitást találtunk, mint a levélben (9. ábra). A nitrogénforrás gyökér GPx aktivitásra gyakorolt hatása azonos volt mindkét esetben, magasabb aktivitást tapasztaltunk a nitráton nevelt növényeknél.



9. ábra: A GPx enzim aktivitásának változása sókezelés hatására a különböző nitrogénforráson nevelt kukorica és napraforgó növényekben. Üres oszlop jelöli a kontroll, kitöltött oszlop a kezelt (100 mM NaCl) növényeket. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek ($P = 5\%$, $n = 3$).

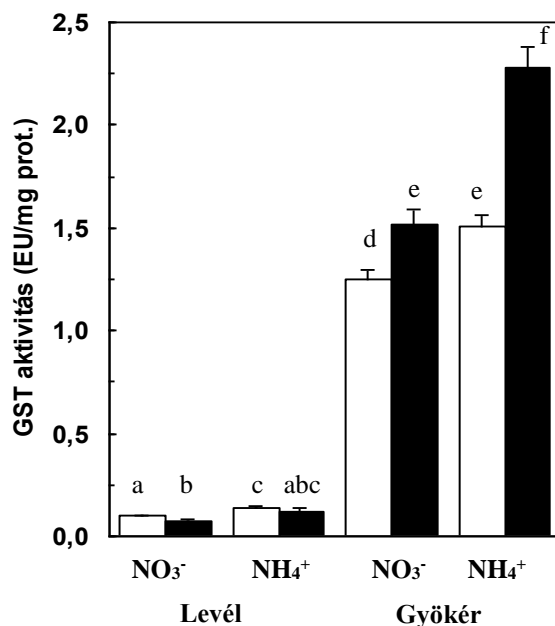
A nitráton nevelt kukorica gyökerének esetében a sókezelés enzimaktivitás csökkenést okozott, míg az ammónián nevelt kukoricában, valamint a napraforgóban a só hatására a GPx aktivitása megnőtt.

Mind a tápoldatban lévő ammónium, mind pedig a só növelte a Kat aktivitást (10. ábra), bár a különbség nem mutatkozott minden esetben szignifikánsnak. Kukoricánál az enzimaktivitás magasabb volt a gyökérben, mint a levélben, de szignifikáns különbség csak az ammóniumon nevelt sókezelt növényekben volt. Napraforgónál a levél mutatott magasabb aktivitást.



10. ábra: A Kat enzim aktivitásának változása sókezelés hatására a különböző nitrogénforráson nevelt kukorica és napraforgó növényekben. Üres oszlop jelöli a kontroll, kitöltött oszlop a kezelt (100 mM NaCl) növényeket. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek ($P = 5\%$, $n = 3$).

GST aktivitást csak kukorica növények esetében értékeltük, mivel napraforgónál ez a kimutatási határ alatt volt (11. ábra). Az ammónium, mint nitrogénforrás növelte az enzim aktivitását a levélben és a gyökérben is, míg a só hatása eltérő volt a különböző növényi szervekben. Levélben a kontroll növények mutattak magasabb enzimaktivitást, míg a sókezelés a gyökérben okozott szignifikánsan magasabb GST aktivitást.



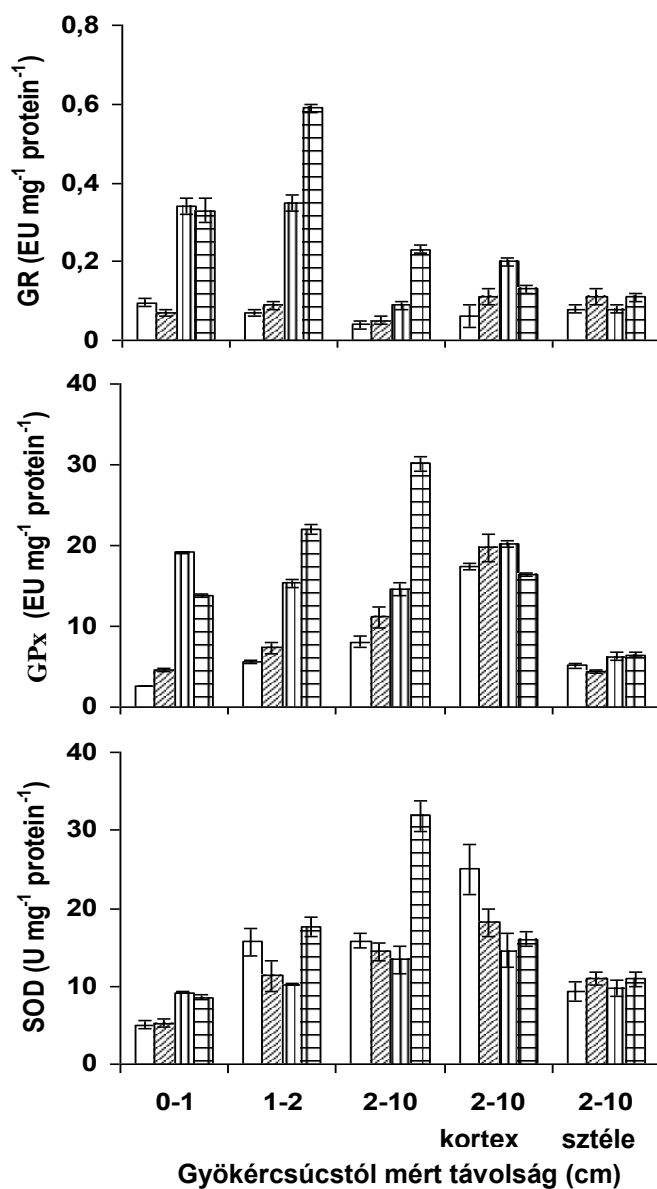
11. ábra: A GST enzim aktivitásának változása sókezelés hatására a különböző nitrogénforráson nevelt kukorica levélben és gyökérben. Üres oszlop jelöli a kontroll, kitöltött oszlop a kezelt (100 mM NaCl) növényeket. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek ($P = 5\%$, $n = 3$).

5.2.4. Antioxidáns enzimek aktivitásának vizsgálata különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és NaCl kezelt kukorica növények különböző gyökérrégióiban

Az eltérő gyökérrégiók különböznek mind anatómiailag, mind pedig a betöltött funkció alapján. Az eltérő élettani folyamatok különbözően reagálhatnak a megváltozott környezeti hatásokra. Ennek vizsgálatához a GR, GPx és SOD enzimek aktivitását vizsgáltuk különböző gyökérszeletekben valamint a kortexben és a sztéleiben. A különböző nitrogénforrás és só hatása a GR, GPx és SOD enzimek aktivitására a kukorica különböző gyökérrégióiban a 12. ábrán látható. Az enzimek aktivitása, a kezelések hatása eltérő az egyes gyökérszeletekben.

A GR aktivitása nem mutatott változást a nitráton nevelt növényekben. Az ammóniumon nevelt növényekben magasabb volt az enzim aktivitása, ami sókezelés esetében tovább emelkedett az 1-2 és 2-10 cm-es régiókban. A GPx esetében szintén az ammóniumon nevelt növényekben mutatkozott magasabb enzimaktivitás. A gyökércsúcsot kivéve az enzim aktivitása nőtt sókezelésre. A SOD aktivitását tekintve kiemelkedő az ammóniumon nevelt sókezelt növények aktivitása. Ha a keresztmetszetet vizsgáljuk az

antioxidáns enzimek aktivitása magasabb volt a kortexben, mint a sztélében. A kezelések szignifikáns változást nem hoztak.

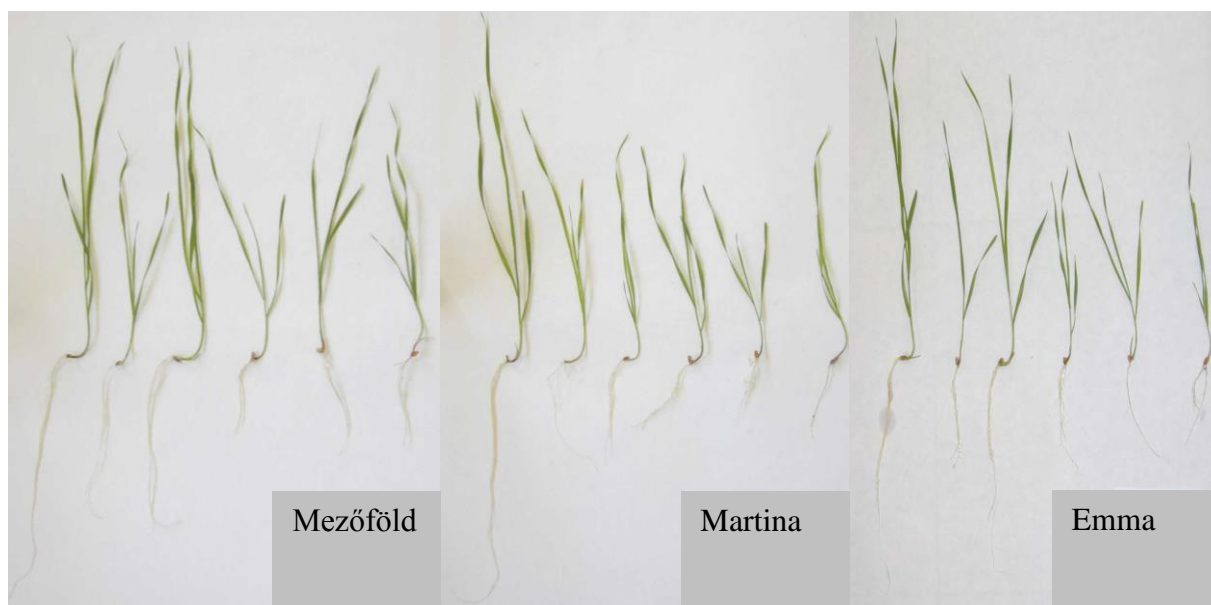


12. ábra: A sókezelés hatása a különböző nitrogénforráson nevelt kéthetes kukorica növény gyökerének hossz- és keresztmetszetében. Minták sorrendje minden esetben a következő: nitrát, nitrát + 100 mM NaCl, ammónium, ammónium + 100 mM NaCl.

5.3. A sókezelés (100 mM NaCl) és a különböző nitrogénforrások hatásának vizsgálata búzában

5.3.1. A NaCl kezelés és a különböző nitrogénforrások hatása 3 búzafajta biomassza produkciójára

A 5.2. pontban tárgyalt kísérletünk kimutatta, hogy a sókezelés és a különböző nitrogénforrások hatással vannak az antioxidáns enzimek aktivitására. Jelen kísérletünkben az antioxidáns enzimek izoenzim mintázatának változásait vizsgáltuk hasonló körülmények között. A növények NO_3^- , NH_4^+ illetve NH_4NO_3 tartalmú tápoldaton nőttek, minden nitrogénforrás esetén rendelkezünk kontroll (0 mM NaCl) és sókezelt (100 mM NaCl) növényekkel. A mintavétel két hetes kezelés után történt, és elemeztük mind a levél, mind pedig a gyökérmintákat. A kísérletben három – eltérő termőképességgel rendelkező - martonvásári nemesítésű búzafajtát vizsgáltunk: Mv Martina, Mv Mezőföld, Mv Emma. Legnagyobb termőképessége a Martina, legkisebb pedig az Emma fajtának van. Ammónium és só hatására növekedésredukciót figyeztünk meg (13. ábra, 7. táblázat). A 7. táblázatban a gátlás mértékét kifejező adatokból (I %) látható, hogy az ammónium-nitráton és az ammóniumon nevelt növények sötétrebbek, mint a nitráton neveltek. A három vizsgált fajta izoenzim mintázatában különbségeket nem találtunk, így a továbbiakban a géleken a Mezőföld eredményei láthatóak.



13. ábra: A sókezelés (100 mM NaCl) hatása a különböző nitrogénforráson nevelt búzafajták esetében, két héttel a kezelés megkezdése után. A minták sorrendje megegyezett mindhárom esetben: NO_3^- , $\text{NO}_3^- + 100 \text{ mM NaCl}$, NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{NO}_3 + 100 \text{ mM NaCl}$, NH_4^+ , $\text{NH}_4^+ + 100 \text{ mM NaCl}$.

7. táblázat: A különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és kezelt (100 mM NaCl) búzanövények biomassza produkciója. FW : friss tömeg (mg), DW: száraz tömeg (mg), I: a sókezelés okozta súlycsökkenés a kontroll %-ában kifejezve Nt: nedvességtartalom.

N forrás		Levél			Gyökér		
		Mezőföld	Martina	Emma	Mezőföld	Martina	Emma
Nitrát	FW Kontroll	882 ± 104	1181 ± 306	922 ± 137	304 ± 13	650 ± 102	415 ± 110
	Kezelt	473 ± 8	509 ± 83	400 ± 51	140 ± 34	154 ± 38	132 ± 6
	I (%)	46,4	56,9	56,6	53,9	76,3	68,2
	DW Kontroll	92 ± 15	115 ± 28	91 ± 13	20 ± 1	37 ± 5	25 ± 7
	Kezelt	67 ± 1	73 ± 13	56 ± 4	12 ± 3	13 ± 4	12 ± 1
	Nt Kontroll	89,6	90,3	90,1	93,4	94,4	93,9
	Kezelt	85,8	85,6	86,0	91,4	91,6	91,3
Ammónium-nitrát	FW Kontroll	627 ± 115	884 ± 141	806 ± 141	211 ± 19	186 ± 43	179 ± 34
	Kezelt	456 ± 73	513 ± 12	623 ± 145	150 ± 18	144 ± 16	139 ± 40
	I (%)	27,3	42,0	22,7	28,9	22,6	22,3
	DW Kontroll	69 ± 12	95 ± 19	86 ± 12	18 ± 3	15 ± 4	17 ± 1
	Kezelt	66 ± 9	73 ± 11	63 ± 7	14 ± 0	12 ± 1	13 ± 3
	Nt Kontroll	89,0	89,2	89,3	91,5	91,7	90,5
	Kezelt	85,6	85,9	89,9	90,7	91,6	90,6
Ammónium	FW Kontroll	578 ± 39	663 ± 193	526 ± 37	97 ± 14	126 ± 9	98 ± 8
	Kezelt	330 ± 168	412 ± 20	336 ± 70	76 ± 34	90 ± 43	71 ± 15
	I (%)	42,9	37,9	36,1	21,6	28,6	27,6
	DW Kontroll	93 ± 8	96 ± 25	86 ± 7	11 ± 2	13 ± 1	9 ± 1
	Kezelt	56 ± 25	63 ± 2	55 ± 6	8 ± 2	9 ± 2	7 ± 1
	Nt Kontroll	84,0	85,5	83,6	89,2	90,0	90,8
	Kezelt	83,2	84,8	83,6	89,5	90,5	90,1

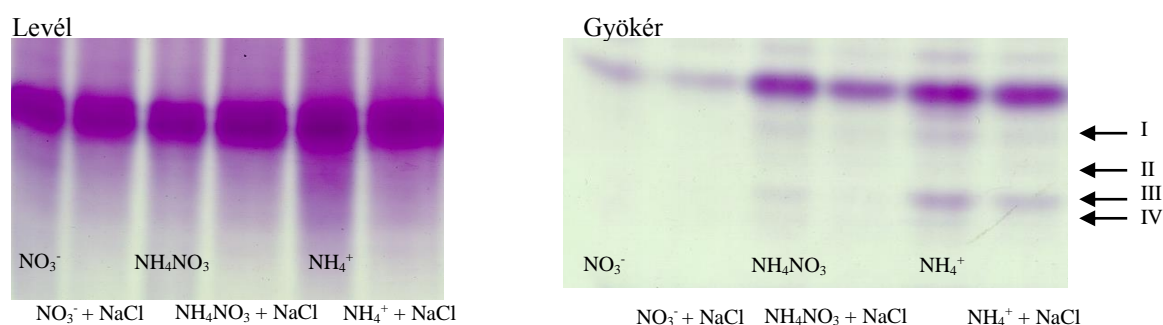
5.3.2. A NaCl kezelés és a különböző nitrogénforrások hatása az antioxidáns enzimek izoenzim összetételére búza levélben és gyökérben

Az antioxidáns enzimek aktivitásában stressz hatására változást figyelhetünk meg. Sok esetben nemcsak az enzim aktivitása változik meg, hanem annak izoenzim mintázata is. Vizsgálataink során a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, kataláz és guajakol peroxidáz enzimek izoformáit különítettük el natív poliakrilamid gélelektroforézis

segítségével. Tanulmányoztuk az egyes nitrogénforrások (NO_3^- , NH_4^+ illetve NH_4NO_3), valamint a sókezelés (100 mM NaCl) hatását az egyes izoformákra.

Glutation reduktáz

A GR esetében alkalmazott festési eljárás nemcsak a GR enzimhez kötődő aktivitásokat jeleníti meg, hanem egy háttéraktivitást is. Ez a háttéraktivitás a diaforáz enzimtől ered, mely többféle festéket képes redukálni. Az általunk használt festésnél is katalizálja az elektronátmenetet a NADPH-ról a DCIP-re, a GSSG jelenlététől függetlenül. Így szubsztrát nélküli festés után a gélben jelentkező sávok alapján GSSG specifikus és nem specifikus izoformákat különíthetünk el, hiszen az általunk keresett GR aktivitás nem jelenik meg, csak szubsztrát jelenlétében. A natív poliakrilamid gélelektroforézist követő, szubsztrát jelenlétében történt festés eredménye a 14. ábrán látható.



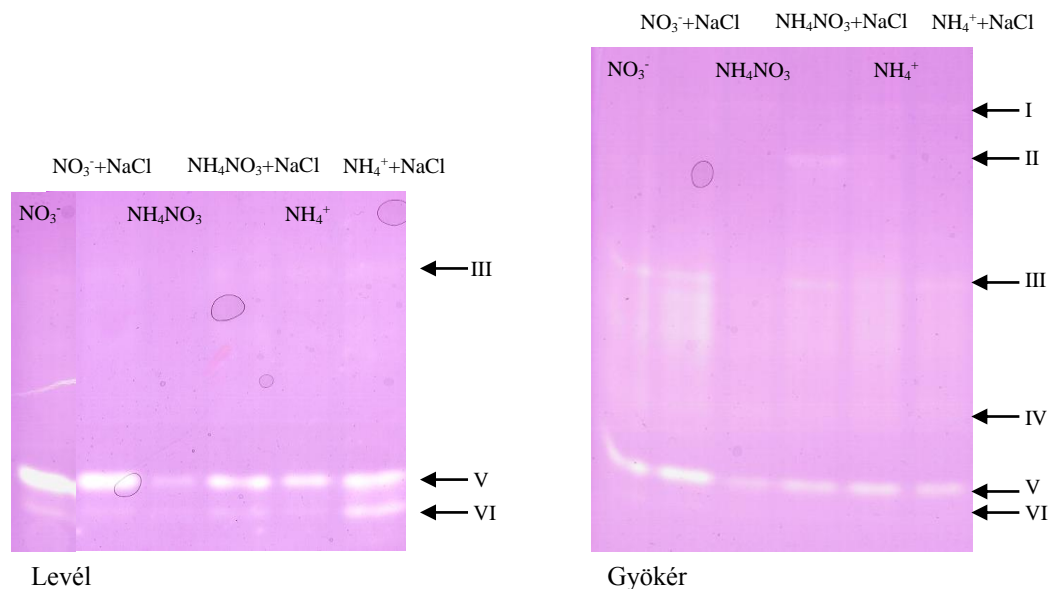
14. ábra: A glutation reduktáz enzim izoformái különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és sókezelt (100 mM NaCl) búza levélben és gyökérben. A zsebekbe azonos fehérjemennyiséget (45 μg) vittünk fel. Nyíllal jelöltük a nitrogénforrás hatására különbséget mutató izoformákat. Ezek közül a IV jelű bizonyult szubsztrátspecifikusnak.

A levélből származó mintákban nem sikerült GR izoformát elkülöníteni natív gélben. A látható sávok egyike sem bizonyult szubsztrát specifikusnak. A gyökérből vett mintáknál több olyan sávot találtunk, mely jelenléte, aktivitása eltérő volt a különböző körülmények között nevelt növényekben (14. ábra, I-IV). Ezen izoformák először NH_4NO_3 -on nevelt növényekben jelennek meg, legerősebben pedig az ammóniumon nevelt növényekben. Ezek közül egynek (IV) az aktivitását találtuk szubsztrátfüggőnek.

Szuperoxid dizmutáz

A SOD enzim aktivitásának meghatározása során a sötét háttérben megjelenő világos sávok jelentik az enzimaktivitást. Mind a levélben, mind pedig a gyökérben több

izoformát tudtunk elkülöníteni (15. ábra). A KCN-ra és H_2O_2 -ra való érzékenységük alapján 1 Mn SOD-ot (III) különítettünk el, míg a többi izoforma Cu/Zn SOD-nak bizonyult.



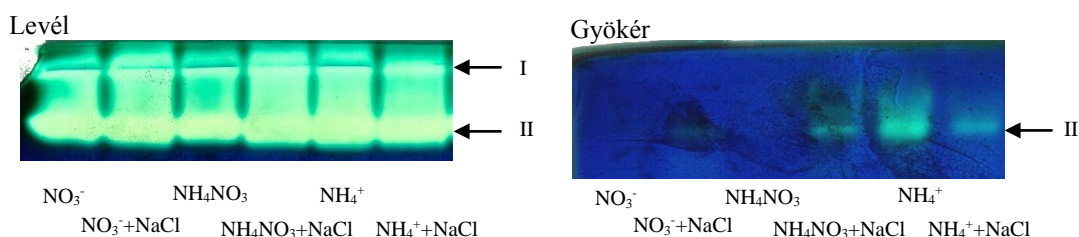
15. ábra: A szuperoxid dizmutáz enzim izoformái különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és sókezelt (100 mM NaCl) búza levélben és gyökérben. A zsebekbe azonos fehérjemennyiséget (45 µg) vittünk fel. Nyíllal jelöltük a különböző izoformákat.

Összességében 6 különböző izoformát tudtunk elkülöníteni. Gyökérben mind a hat, míg levélben ezekből három izoforma volt azonosítható. Az egyes izoformák aktivitásbeli különbséget mutattak az egyes kezelések esetén. A sókezelés aktivitásnövelő hatása mind a levélben (kivétel a nitrát esetében), mind pedig a gyökérben jól látható. A III. izoforma ammóniumon nevelt növények gyökerében csak sókezelés hatására jelent meg, míg ha nitrát volt a N-forrás, már sókezelés nélkül is jelen volt. A II-vel jelölt izoforma csak az ammóniumnitráton nevelt növények gyökerében volt kimutatható.

Kataláz

A Kat enzimnél a levélben kettő izoformát különítettünk el. Kat esetében is az enzim aktivitását a sötétkék háttérben megjelenő világos sávok jelzik (16. ábra). A gyökérben II-vel jelöltük az egyetlen jelenlevő izoformát, mivel vándorlása alapján ez megegyezik a levélben található II izoformával. Mind a levélben, mind pedig a gyökérben megfigyelhető, hogy a legerősebb aktivitás a sókezelt növényekben jelentkezik, illetve

azokkal azonos az ammóniumon nőtt kontroll növények Kat aktivitása. Ez leginkább a II izoformára jellemző.

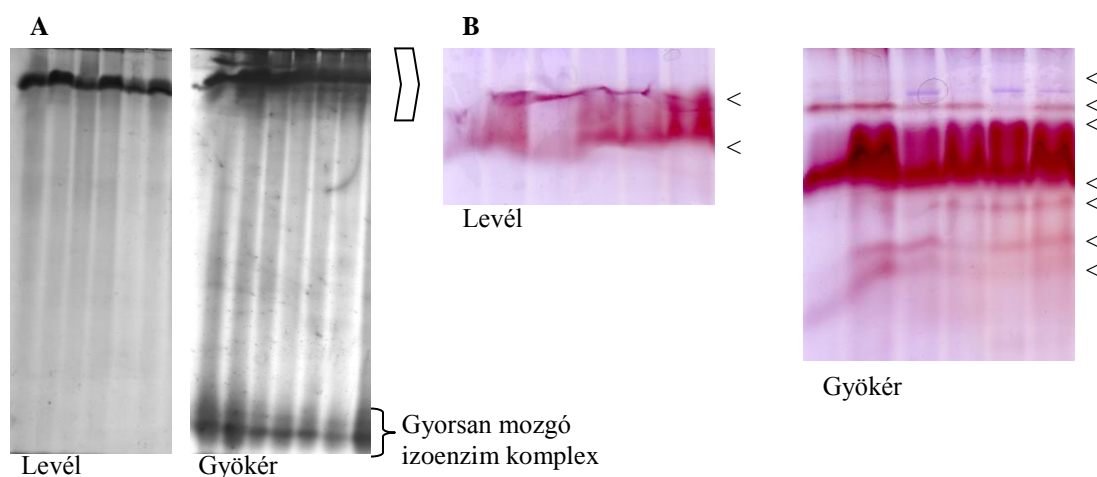


16. ábra: A Kataláz enzim izoformái különböző nitrogénforráson nevelt kontroll és sókezelt (100 mM NaCl = S) búza levélben és gyökérben. A zsebekbe azonos fehérjemennyiséget (45 µg) vittünk fel. Nyíllal jelöltük a különböző izoformákat.

Gyökérben még élesebben látható a különbség, hiszen az izoforma csak a sókezelt növényekben detektálható, illetve kontroll növények közül azokban, ahol a nitrogénforrás ammóniumion volt. Megfigyelhető, hogy az ammóniumon nevelt növények gyökerében a kontroll esetében magasabb az aktivitás.

Guajakol peroxidáz

GPx enzim vizsgálatakor 5 órás futtatás során gyökérben az izoformák két csoportját különítettük el (17.A. ábra). A gyorsabban mozgó izoformák esetén két izoforma különült el, míg a lassabban mozgó formák elkülönítéséhez 16 órás elektroforézist állítottunk be. Ennek eredménye a 17.B. ábrán látható.



17. ábra: A guajakol peroxidáz enzim izoformáinak változása sókezelés (100 mM NaCl) hatására különböző nitrogénforráson nevelt búza levélben és gyökérben. Az A ábrán 5 órás PAGE eredménye látható, míg a B ábra 16 órás futtatás eredményét mutatja. A GPx-nek azonosított izoformákat nyílhegyek jelzik a B ábrán. A mintafelvétel sorrendje minden esetben megegyezett: NO_3^- , $\text{NO}_3^- + \text{NaCl}$, NH_4^+ , $\text{NH}_4^+ + \text{NaCl}$, NH_4NO_3 , $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{NaCl}$ kezelések. A zsebekbe azonos fehérjemennyiséget vittünk fel (45 µg).

Levélben kettő, míg gyökérben hét izoformát különítettünk el. Ezek jelen voltak minden kezelésnél, de aktivitásuk különbözött. A gyökérben lévő első két izoforma nagyobb aktivitást mutatott nitráton nevelt, valamint sókezelt növényekben, míg az összes többi izoforma aktivitása ammónium hatására, illetve sókezelés esetén volt nagyobb.

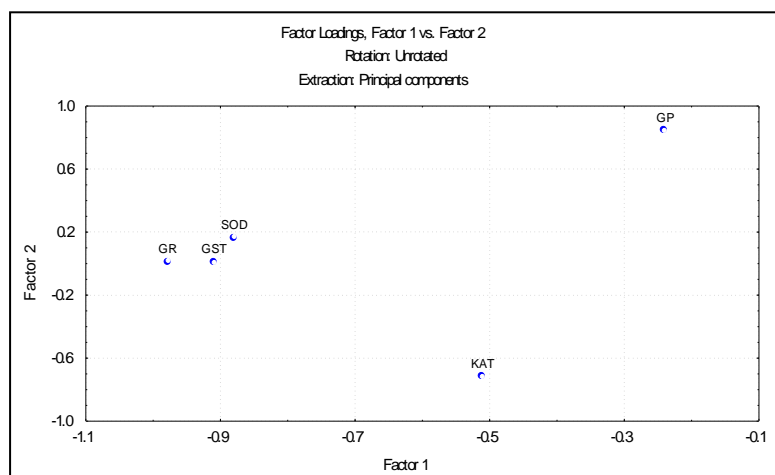
5.4. Az antioxidáns enzimek működésének statisztikai összehasonlítása sókezelt (100 mM NaCl) növényekben

A dolgozatban már elemzett kísérletek, korábbi munkák és tudományos együttműködések lehetővé tették, hogy az antioxidáns enzimek aktivitásának változásait egymással összehasonlítva, statisztikailag elemezzük. Különböző fajok kontroll és sókezelt (100 mM NaCl) növényeinek 2 hetes kezelés utáni enzimaktivitás adatait vettük figyelembe. Az ismétlésszám ($n = 6$) lehetővé tette korreláció- és főkomponens-analízis, valamint T-teszt elvégzését. Az eredmények összehasonlíthatóságának érdekében az analízishez a kezelt növények aktivitásának a kontroll %-ában kifejezett értékét használtuk. Korrelációt ($P < 0,05$) csak a GR és SOD enzimek között találtunk (8. táblázat). A T-teszt segítségével szignifikáns különbség nem volt kimutatható az egyes enzimek között.

8. táblázat: Korrelációs együtthatók. Az enzimek rövidítései: glutathion reduktáz (GR), szuperoxid diszmutáz (SOD), guajakol peroxidáz (GPx), kataláz (Kat), glutathion-S-transferáz (GST). A *-gal korrelációt jelöltünk ($P < 0,05$, $n = 6$, kritikus érték: 0,8114).

	GR	SOD	GPx	Kat
GST	0,806	0,751	0,195	0,41
Kat	0,526	0,148	-0,259	
GPx	0,273	0,155		
SOD	*0,871			

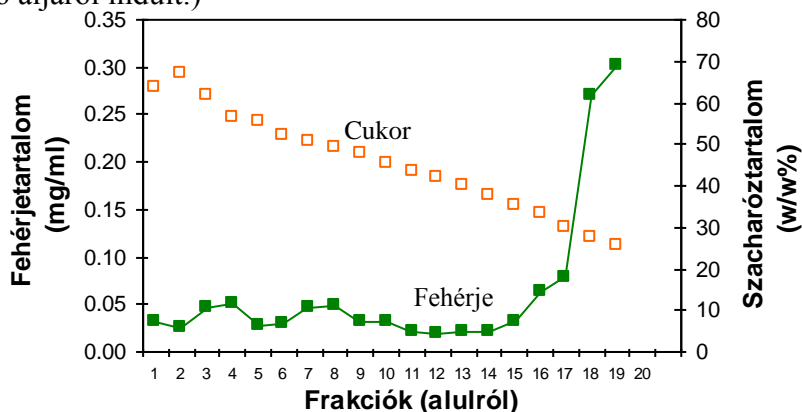
A főkomponens-analízis eredménye (18. ábra) alapján az általunk kialakított kísérleti rendszerben az enzimek közül sóstresszre adott válasz kialakulása a GR, SOD és GST enzimek esetében hasonló mechanizmusok alapján történik, míg a Kat és GPx elkülönül a csoporttól, és egymástól is. Ez azt mutatja, hogy a GR, SOD, GST függ az általunk 1-nek jelölt faktortól, míg Kat és GPx a 2-től.



18. ábra: Főkomponens-analízis eredménye. Az enzimek rövidítései: glutation reduktáz (GR), szuperoxid dizmutáz (SOD), guajakol peroxidáz (GP), kataláz (KAT), glutation-S-transzferáz (GST).

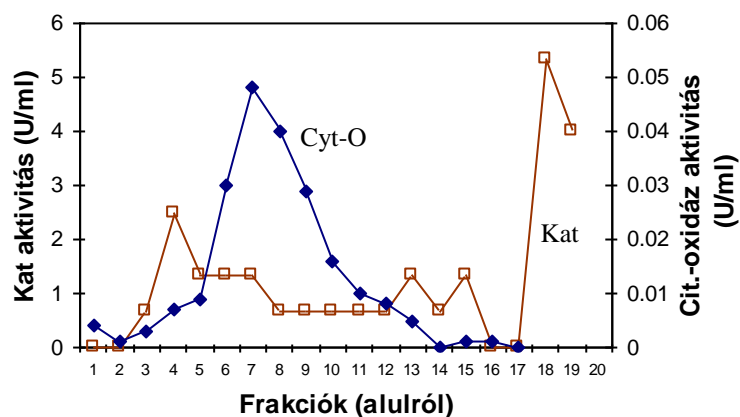
5.5. Aldehid oxidáz jelenlétének vizsgálata kukorica gyökér mitokondriumban és peroxiszómában

Kísérletünkben vizsgálni kívántuk az aldehid oxidáz (AO) jelenlétét különböző sejtorganelumokban (mitokondrium, peroxiszóma) kukorica gyökérben. Korábbi kísérletek igazolták, hogy az enzim nagy mennyiségben megtalálható olyan kukorica növények gyökerében, melyek ammóniumiont használtak nitrogénforrásként. Ezért kísérletünkben ammóniumiont tartalmazó tápoldatban nevelt növényeket használtunk. A sejtalkotók preparálásához 25-57% folyamatos szacharóz grádiens használtunk. Ennek segítségével ultracentrifugálással különítettük el a mitokondriumot és a peroxiszómát. A 19. ábrán látható az egyes frakciók cukor- és fehérjetartalma. (A frakcionálás a centrifugacső aljáról indult.)



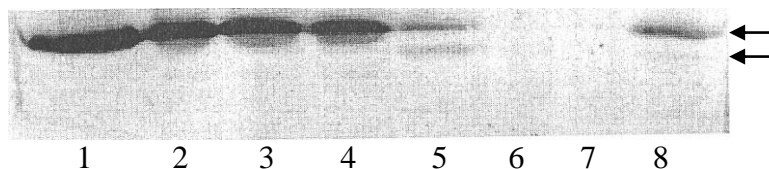
19. ábra: A sejtorganelum preparáláshoz használt cukorgrádiens frakcióinak szacharóz- és fehérjetartalma.

Az egyes sejtalkotók jelenlétét marker enzimek aktivitásának mérésével határoztuk meg. A mitokondrium azonosítására citokróm-oxidáz enzimet, míg a peroxiszóma azonosításához katalázt használtunk. A citokróm-oxidáz és kataláz enzimek aktivitása látható az egyes frakciókban a 20. ábrán.



20. ábra: A kataláz és citokróm-oxidáz enzimek aktivitása az egyes frakciókban.

A tisztítás egyes lépéseiből, valamint a kiválasztott frakciókból futtattunk mintákat natív poliakrilamid gélen, az AO enzim aktivitásának meghatározásához (21. ábra). A teljes extraktumban, illetve a kezdeti tisztítási lépéseknél jól elkülöníthető az enzim, míg a mitokondrium és peroxiszóma frakciókban nem tudtuk kimutatni az enzim jelenlétét.



21. ábra: A aldehid oxidáz enzim izoformáinak jelenléte a peroxiszóma és mitokondrium tisztítás egyes lépéseinél. A felvitt mintamennyiség minden esetben 100 μ l volt. A szubsztrát indol-3-aldehid. A mintasorrend a következő volt: 1. kontroll, kukorica gyökérből készült extraktum, 2. a feltárás első, teljes extraktuma, 3. 1500 rpm felülúszó, 4. 8500 rpm felülúszó, 5. 8500 rpm üledék, 6. peroxiszóma frakció, 7. mitokondrium frakció, 8. utolsó elkülönített frakció. A nyilak a különböző izoformákat jelölik.

6. AZ EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

6.1. Sókezelés hatása a glutation reduktáz (GR) aktivitására és napiritmusára

A GR-nak, mint az aszkorbinsav-glutation ciklus elemének fontos szerep jut a növények antioxidáns védekező mechanizmusában. Aktivitásának változásából képet kaphatunk a környezeti stressztényezők növényre gyakorolt hatásáról. Kísérletünkben a GR enzim aktivitásában különböző mértékű sókezelés (50, 100, 150 mM NaCl) hatására bekövetkező változásokat vizsgáltuk. Megfigyeléseinket kiegészítettük az enzimaktivitás időbeli változásának nyomonkövetésével oly módon, hogy a kezelést követően óránként, hatvan órán keresztül vettünk mintát.

Különböző mértékű sókezelés hatása a GR aktivitására

A só egy olyan környezeti stresszfaktor, amely limitálja a növények növekedését és fejlődését. A növényi szervezet összetett módon válaszol a környezetében felhalmozódó, feleslegben lévő NaCl-ra. Mindez morfológiai, élettani és anyagcsere változásokat foglal magába. Az irodalmi adatok alapján a sóstressznek is, mint minden egyéb stressztípusnak van oxidatív komponense (De Kok és Oosterhuis, 1983; Hernández, 1993), és így a sóstressz elleni védekezőmechanizmusokban az antioxidáns védekezőrendszernek (így a GR-nak is) jelentős szerep jut.

NaCl kezelés hatására csökkenő GR aktivitást találtak paradicsomban (Shalata és Tal, 1998) és rizs esetében (Fadzilla és mtsai, 1997). Búzában végzett kísérletek (Meneguzzo és mtsai, 1999), ahol 0 mM, 50 mM és 100 mM NaCl kezelést alkalmaztak azt mutatták, hogy növekvő sókoncentráció mellett a GR aktivitása alig változik, illetve csökken gyökérben, míg növekedést mutat levélben. Az aktivitás csökkenését egy sóstresszre toleráns fajtában mutatták ki. A különböző sókezelés ebben az esetben sem hozott arányos mértékű aktivitásváltozást. De Kok és Oosterhuis (1983) spenót levelében végzett vizsgálatok során azt tapasztalták, hogy az általuk használt sókezelés (0, 75, 150 mM NaCl) nem volt hatással a GR aktivitására. Jelen kísérletünkben kapott eredmények (3. ábra) azt mutatják, hogy egyes sókoncentrációk képesek növekedést indukálni a GR enzim aktivitásában, mind levélben, mind pedig gyökérben. Az eredmények és az irodalmi adatok

azt mutatják, hogy az antioxidáns enzimrendszer só stresszre adott válasza nemcsak fajonként mutat eltéréseket, hanem azonos fajba tartozó fajták esetében is. Éppen a válasz sokfélesége és a só stressz komplex volta teszi nehéz feladattá a sótolerancia definiálását (Dionisio-Sese és Tobita, 1998), mely fontos volna a rezisztencia nemesítés szempontjából.

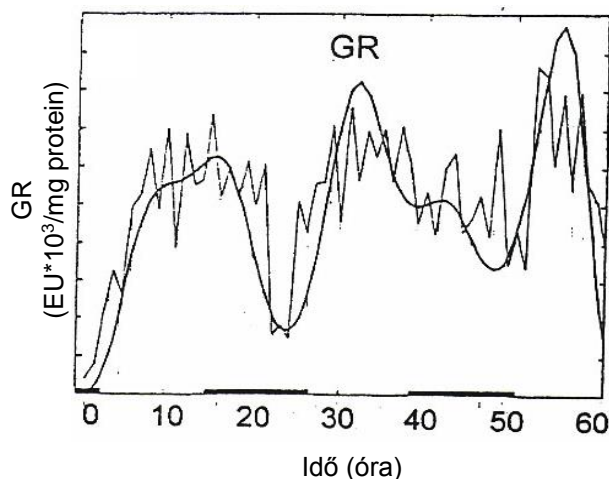
Megállapíthatjuk, hogy az arányosan növekvő sókoncentráció, ezzel együtt a növekvő mértékű stresszhatás nem feltétlenül vonja maga után a GR enzim aktivitásának növekedését. Ez magyarázható azzal a ténnyel, hogy az antioxidáns védekezőrendszer igen összetett rendszer, így a GR enzim nem egymagában felelős a sóstressz hatásainak kiküszöböléséért. Az sem bizonyított még, hogy a növekvő stresszhatás arányosan vonná maga után a magasabb szabadgyök produkciót, illetve elképzelhető az, hogy az általunk használt sókoncentráció már egyfajta telítettséget okozott a védekezőrendszer működésében.

Napiritmus és változásai

Relative kevés példa van a napiritmus meglétére az enzimaktivitásokban. Ennek egyik oka lehet, hogy a fehérjék stabilak, a génexpresszió változása nem okoz detektálható oszcillációt a fehérje szintjén (Tucker és Ort, 1998). Mivel a cirkadián ritmus számos – az egész növényre jellemző – folyamatban megfigyelhető, sok enzimnek kell cirkadián ritmussal rendelkeznie. Cirkadián ritmus az enzim aktivitásában több módon alakulhat ki: fehérje mennyiségének változása, változó szubsztrát, illetve allosztérikus effektor koncentráció, változások a fehérje foszforiláció, illetve redox állapotában (Tucker és Ort, 1998).

Az antioxidáns enzimrendszer néhány eleméről – pl. kataláz izoformái (Redinbaugh és mtsai, 1990) és SOD (Colepicolo és mtsai, 1991) - megállapították, hogy expressziójuk belső óra által irányított gének szabályzása alatt áll. Kocsy és mtsai (1997) a védekezőrendszer elemeinek napiritmus szerinti aktivitás változásáról tájékoztattak. Munkájukban a napi ritmus meglétét a fény/sötét periódus változásaival magyarázták. Fényben megnő a gerjesztett molekulák koncentrációja (Foyer és mtsai, 1994a), és ez alátámaszthatja a megfigyeléseiket, de a mi munkánk esetében ez nem ad kielégítő magyarázatot a megfigyelt jelenségekre. A 4. ábrán látható, hogy a GR enzim aktivitásának változása oszcillációt mutat mind a levél, mind pedig a gyökér esetében,

valamint az is megfigyelhető, hogy az enzimaktivitás növekedése már a sötét periódusban megkezdődik, ami azt sugallja, hogy az enzimaktivitás változásának ritmusa közvetlenül nem fényindukált. A periódusidő pontosabb meghatározásához, illetve a ritmus meglétének matematikai bizonyítékául Fourier-transzformációt használtunk. Ennek eredménye az 5. ábrán látható. Vizsgálatunkban a sókezelés nem volt hatással a periódusra, bár az ultradián ritmusok megléte eltér kezelésenként. A sókezelés hatására bekövetkező amplitúdó növekedés jól megfigyelhető a gyökér esetében (5.B ábra).



22. ábra: Az oszcilláció összetettségét szemléltető ábra, melyen a folyamatos vonallal ábrázolt frekvenciaszűrőssel nyert görbét hasonlíthatjuk a kiindulási görbéhez. Az analízishez a kísérletünkben kapott kontroll eredménysort használtuk fel. Vastag vonal jelzi a sötét periódust.

A belső ritmust meghatározó folyamatok összetettségét szemlélteti a 22. ábra, mely mutatja, hogy akár 6 oszcilláló komponenst is feltételezhetünk a változás mögött. A változás komponenseinek és okainak pontos meghatározása további vizsgálatokat igényel. Kísérletünk eredményeiből megállapítható: i) A GR enzim aktivitása ultradián és cirkadián ritmust mutat. ii) A sókezelés az oszcilláció amplitúdóját növelte, míg a periódust változatlanul hagyta. iii) Az ultradián ritmusok sókezelésre érzékenyek mutatkoztak.

6.2. A só és különböző nitrogénforrások hatása a növények antioxidatív enzimrendszerére

A nitrogén, mint ásványi elem igen fontos a növények fejlődéséhez. Leggyakrabban felvett nitrogénforrások a nitrát és az ammónium, melyekről már korábban kimutatták, különböznek a növények növekedésére és kémiai összetételére gyakorolt hatásukban (Lewis and Chadwik, 1983; Lips és mtsai, 1990; Cramer és Lewis, 1993). A különböző

formában adott nitrogén nemcsak a kontroll körülmények között nevelt növények növekedésére hat, hanem bizonyos feltételek mellett befolyásolja a sótűrést is (Lewis és mtsai, 1989). Ezen növények sóstresszre adott válaszainak összehasonlítását érdekessé teszi, hogy több természetes és mezőgazdasági művelés alatt álló sós terület nitrogénben szegény (Seeman és Sharkey, 1986). A vizsgálatok lehetőséget mutathatnak a só hatásának csökkentésére az adott körülmények között nevelt növények esetében. A só és különböző nitrogénforrások együttes alkalmazásának, termésre, fotoszintézisre és nitrogén anyagcserére gyakorolt együttes hatását több laboratóriumban vizsgálták (Lewis és mtsai, 1989; Hawkins és Lewis, 1993a,b). A téma iránti érdeklődésünket fokozta az a tény, hogy a növények stresszválaszainak kialakításában fontos hormon, az abszcizinsav (Kende és Zeevaart, 1997) mennyisége *Ricinus communis* levelében és gyökerében is megnőtt ammónium táplálás és só stressz hatására, míg a nitrát hatása ezzel ellentétes volt (Peuke és mtsai, 1994). Kísérleteinkben a növényi stresszválasz kialakításában fontos szerepet játszó másik rendszer, az antioxidáns védekezőrendszer enzimatisz elemein keresztül vizsgáltuk ezen körülmények növényekre gyakorolt hatását.

A sókezelés és különböző nitrogénforrások hatása a biomassa produkcióra

A tápoldatban lévő ammónium és a sókezelés redukálta mind a kukorica, mind pedig a napraforgó növekedését (7. táblázat), és ugyanezt figyeltük meg búza esetében is (8. táblázat). Korábban már voltak hasonló megfigyelések. Lewis és mtsai (1989) kukoricában (*Zea mays* L. var. Hazera) és búzában (*Triticum aestivum* L. var. Barkay), Hawkins és Lewis (1993a) búzában (*Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos) mutatták ki a növekedés csökkenését só- és ammóniumkezelés hatására. Az eddigi vizsgálatok alapján a következő lehetséges magyarázatok merültek fel: i) A hajtásból a gyökérbe irányuló szén transzlokáció. Erre a gyökérben zajló ammónium asszimilációhoz van szükség (Lewis, 1986). ii) A só csökkenti a nitrogénfelvétel maximális sebességét (V_{max}) a nitráton és az ammóniumon nevelt növények mindegyikében (Lewis és Chadwick, 1983; Hawkins és Lewis, 1993a). iii) Az ozmoreguláció ATP igényének kielégítéséhez nagy mennyiségű szénhidrátot használ fel a gyökér, így kevesebb jut nitrát redukcióra, illetve ammónium asszimilációra (Cramer és mtsai, 1995). iv) A só gátolja a nitrátranszportot a gyökérből a hajtásba (Cramer és mtsai, 1995), ehelyett amidok szállítódnak, de alacsonyabb

koncentrációban. Ennek eredménye, hogy a hajtásban csökken a növekedéshez szükséges szerves N mennyisége.

Vizsgálataink eredményei kiegészítik az eddigieket azzal, hogy ebben az esetben is fellép egyfajta oxidatív stresszhatás, és ez is hozzájárul a növekedés csökkenéséhez, ahogy ezt már oxidatív stressz jelenlétekor több esetben is megfigyelték (Barabás és mtsai, 1998; Hilal és mtsai, 1998). Az eddig ismert adatok alapján elképzelhető, hogy a fenti elméletek egyfajta szintézise lesz az, ami közelebb visz bennünket a jelenség megértéséhez.

Sókezelés és különböző nitrogénforrás hatására végbemenő változások az antioxidáns enzimek aktivitásában kukorica és napraforgó növényekben

Az élő szervezetben zajló anyagcserefolyamatok normális körülmények között is termelnek szabad gyököket és aktivált oxigén formákat. Ezen toxikus származékok mennyisége megnő minden környezeti és ember által okozott stresszhatásra. A növények hatékony védekezőrendszerrel rendelkeznek, amely megvédi őket a roncsoló hatású oxidatív reakcióktól (Foyer és mtsai, 1994a,b). E rendszer részeként az antioxidáns enzimek kulcsszerepet játszanak a védekező mechanizmusokban.

A kukoricával és napraforgóval végzett vizsgálatainkban általában magasabb enzimaktivitást találtunk gyökérben, mint levélben (7-11. ábra). Kivételt képeznek napraforgó esetében a GR és Kat enzimek, ahol a levélben magasabb enzimaktivitást detektáltunk. Meneguzzo és mtsai (1999) sókezelt búza növények hajtását és gyökerét tanulmányozták. Az általuk vizsgált enzimek közül az aszkorbát peroxidáz, monodehidro-aszkorbát reduktáz és dehidro-aszkorbát reduktáz a gyökérben mutatott magasabb aktivitást, míg a GR esetében nem volt szignifikáns különbség a gyökér és a hajtás között. A sóstressz, a szárazság vagy éppen a tápanyaghiány, mind olyan stresszhatások, melyek a gyökéren keresztül érzékelhetők a növény számára, és ez szolgálhat magyarázatul a gyökérben található magasabb enzimaktivitásra. Ezzel ellentétes pl. az UV-B sugárzás, melynek érzékelése a levél szintjén történik. Az antioxidáns rendszer működését vizsgálva Barabás és mtsai (1998) magasabb antioxidáns szintet (GSSG) és GR aktivitást találtak az UV-B kezelt búza növények levelében, mint a gyökérben.

A sókezelés hatására gyökérben a legtöbb esetben (nitráton nevelt növények GPx aktivitását kivéve) megnőtt az antioxidáns enzimek aktivitása. Levélben a növekedés mértéke alacsony, sőt egyes esetekben az enzim aktivitása csökkent. Az irodalomban több

adatot is találunk a sóstressz antioxidáns enzimekre gyakorolt hatásáról. A GST aktivitásának növekedését mutatták ki gyapotban (Fowler és mtsai, 1997), uborkában Lechno és mtsai (1997) a GR és a Kat aktivitásának, míg Fadzilla és mtsai (1997) rizs gyökérkultúrában a SOD és a Kat aktivitásának növekedését figyelték meg. Sókezelt borsóban magasabb SOD és GR aktivitást találtak (Hernández és mtsai, 1999). Meneguzzo és mtsai (1999) búzával beállított kísérletükben azt az általános tendenciát figyelték meg, hogy az antioxidáns enzimek aktivitása nőtt a hajtásban és csökkent a gyökérben sóstressz hatására.

Az eredmények sokfélesége mutatja, hogy egy bonyolult rendszerről van szó. A só hatása egy igen összetett folyamat, amely függ a só fajtájától és koncentrációjától, a növény fejlődési stádiumától, és a környezeti faktoroktól (Shannon és mtsai, 1990). Még nem teljesen tisztázott, hogy a NaCl miként befolyásolja az antioxidáns válaszreakciókat. A hatást okozhatja i) a Cl^- toxikus hatása a PSII-re, vagy ii) a membrán szerkezetének megváltozása, melyet a magas $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ arány vált ki (Meneguzzo és mtsai, 1999).

A GST enzim aktivitása nőtt sókezelésre (11. ábra). Rodríguez-Rosales és mtsai (1999) 100 mM NaCl-al kezeltek kontroll és sótoleráns paradicsom kalluszokat, és magasabb GST aktivitást figyeltek meg a sótoleráns kalluszok esetében. Mindezek jól alátámasztják azt a tényt, hogy ez az enzim a növényi sejt számára segítséget nyújt ahhoz, hogy sikeresen kiküszöbölhesse a sókezeléssel járó lipid peroxidáció negatív hatásait (Fowler és mtsai, 1997).

A NO_3^- és NH_4^+ táplálás (Bendixen és mtsai, 2001), valamint a só és különböző N-források együttes hatásának különböző biokémiai folyamatokra gyakorolt hatását több publikációban feldolgozták (Sagi és mtsai, 1998; Omarov és mtsai, 1998). Feltételezik, hogy az ammónium, vagy egyik asszimilációs terméke (glutamin vagy glutamát) szolgálhat stresszszignálként, valamint az ammóniumon nevelt növényekben olyan anyagcsereutak indukálódhatnak, melyek több aktívált oxigén származék felszabadulását okozzák. A GR (7. ábra) a napraforgóban, GST kukoricában (11. ábra) és a Kat mindkét fajban (10. ábra) magasabb aktivitást mutat ammóniumon nevelt növények esetében, míg a SOD (8. ábra) és a GPx (9. ábra) ezzel ellentétesen változott. A két enzim azonos aktivitás mintázatot mutatott, ami a köztük fennálló termék-szubsztrát kapcsolattal magyarázható. A SOD a $\cdot\text{O}_2^-$ dizmutációját katalizálja, miközben H_2O_2 keletkezik. A SOD által termelt H_2O_2 -ot a GPx képes semlegesíteni. Polle és mtsai (1994) vizsgálták a különböző arányú nitrát és ammónium keverékén nevelt norvég fenyőben a nitrogénforrás és az antioxidáns

enzimek kapcsolatát. Érdekes egybeesés, hogy a legmagasabb GR aktivitással az ammóniumon nevelt növények rendelkeztek, míg a SOD aktivitása ebben az esetben volt a legalacsonyabb.

Az eredményekből feltételezhető, hogy a szabadgyök produkció magasabb azon növények esetében, melyek ammóniumot használnak, mint N-forrást. Itt megemlíthető Jiang és mtsainak (1995) munkája, akik különböző nitrogénforrásokat tartalmazó táptalajok hatását vizsgálták *Anabaena* PCC 7120 nitrogénfixáló cianobaktérium génexpressziójára és fehérjeszintézisére. Összehasonlítva az ammóniumon vagy nitráton nevelt kultúrákat és a nitrogén fixálókat megállapították, hogy a GR fehérje mennyisége megnőtt, összehasonlítva a másik kettővel. Azt is kimutatták, hogy ez az emelkedés már génexpresszió szintjén jelentkezik. Pontos magyarázattal nem szolgáltak, miért is kell egy antioxidáns enzimnek nitrogén forma által szabályozottnak lennie, de feltételezték, hogy ez egy másodlagos hatás. Valószínűsítették, hogy az általuk tapasztalt felgyorsult növekedéshez aktívabban működő fotoszintézis szükséges, és ez maga után vonja a nagyobb mértékű szabadgyök termelést.

Korábbi eredmények már kimutatták, hogy az alkalmazott N-forrás fajtája nemcsak a kontroll körülmények között nevelt növények növekedésére hat, hanem befolyásolja a növény sótűrését is bizonyos körülmények között (Lewis és mtsai, 1989). Ezt támasztja alá az antioxidáns védekezőrendszer részéről a GR, Kat és GST enzimek aktivitásváltozása (7., 10. és 11. ábra), ahol a sókezelés hatására kialakuló enzimaktivitás magasabb az ammóniumon, mint a nitráton nevelt növényeknél. Más enzimrendszerek (Mo-enzimek: aldehid oxidáz, xantin dehidrogenáz és nitrát reduktáz) esetében hasonló eredményekre jutottak kukorica (Barabás és mtsai, 2000), árpa (Omarov és mtsai, 1998) és angolperje (Sagi és mtsai 1998) esetében.

Mindezekből feltételezhető, hogy az ammóniumion stressz-szignálként szolgál, amely néhány – a korai stressz-adaptációs folyamatokért felelős – enzim aktivációját indukálja.

Különböző gyökérrégiók vizsgálata

A növények szervein belül különböző fajtájú és korú sejtek találhatók, így feltételezhető, hogy funkciójuk és a környezet hatásaira adott válaszaik eltérő helyüktől és fejlődési stádiumuktól függően (Hilal és mtsai, 1998). A gyökér nagyszerű objektum a só növekedésre és egyéb paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatához a következők

miatt: (a) egy meghatározott növekedési régió található a gyökércsúcsban és egy elkülönülő, öreg, megnyúlt sejtekből álló, nem osztódó régió a gyökércsúctól távolabb (Ishikawa and Evans, 1995). (b) A gyökérsejtek közvetlenül kitehetők különböző NaCl koncentrációknak a tápoldat cseréjével (Hilal és mtsai, 1998).

A gyökér a növénynek az a része, amely elsőként érzékeli a sós környezetet, szárazságot, vagy anoxiát. Éppen ezért az adaptációs folyamatok elsődleges vonalát képviseli. A gyökér transzverzális és longitudinális tengelye mentén meglévő anatómiai és funkcionális különbségek biokémiai folyamatokkal való összefüggéseit már korábban vizsgálták (Zeleneva és mtsai, 1982). Barabás és mtsai (2000) különbségeket mutattak ki a Mo-enzimek térbeli eloszlásában kukorica növényben. Ezen enzimek aktivitása kiemelkedően magas volt a gyökércsúcsban és a sztélében. A GPx és SOD (16. ábra) aktivitás általában magasabb volt az idősebb gyökérrégiókban, míg a GR nem mutatott különbségeket nitráton nevelt növények esetében (12. ábra), ugyanakkor az ammóniumon nevelt növények fiatalabb régióiban találtunk magasabb aktivitást. A gyökér keresztmetszetét tekintve az antioxidáns enzimek aktivitása magasabb volt a kortexben, mint a sztélében. Ki kell emelnünk, hogy a különböző kezelések antioxidáns enzimekre gyakorolt hatása eltér a gyökér csúcsi régiójában a teljes gyökérben tapasztaltaktól.

A gyökér vizsgálata során kapott információk rámutatnak arra, hogy a gyökér egyes részei, melyek anatómiailag és funkcionálisan is különbségeket mutatnak, eltérnek a bennük lévő antioxidáns enzimek aktivitásában is. Ezt a gyökérben zajló élettani folyamatok eltérő érzékenysége magyarázhatja. Ezek pontosabb felderítéséhez az egyes funkcionálisan elkülönülő gyökérrégiók részletes vizsgálatára van szükség.

Változások az antioxidáns enzimek izoenzim mintázatában sókezelés és különböző nitrogénforrás hatására búzában

Mivel a különböző stresszhatások eltérően hathatnak a sejtekre és sejtalkotókra, az élő szervezetekben az antioxidáns enzimeknek több formája megtalálható (izoenzimek), melyek a különböző sejtorganellumokban találhatók. (Tsang Ed és mtsai, 1991). Transzgenikus növényekkel folytatott vizsgálatok kimutatták, hogy a növények aktivált oxigénszármazékokkal szembeni ellenállóképessége sokkal inkább függ a sejtben működő teljes védekezőrendszer együttműködésétől, mint egyetlen enzim aktivitásától (Sen Gupta és mtsai, 1993b; Slooten és mtsai, 1995).

A GR enzim izoformáira nézve elég változatos képet tükröz az irodalom. Különböző technikák alkalmazásával – ioncserés kromatográfia, izoelektromos fókuszálás, natív PAGE – sikerült GR izoformákat azonosítani dohányban (Foyer és mtsai, 1991), spenótban (Guy és Carter, 1984) és fenyőben (Wingsle és Karpinski, 1996). Megállapítható, hogy néhány fajban több GR izoforma is található. Edwards és mtsai (1994) azt találták, hogy a GR izoenzim mintázata megváltozhat a növény növekedése során stressz hatására. Új izoforma megjelenését bizonyították hidegedzés hatására spenótban és lucfenyőben (Guy és Carter, 1984; Hausladen és Alscher, 1994).

Jelen kísérletünkben a sókezelés (100 mM NaCl) hatását vizsgáltuk különböző nitrogénforráson (NO_3^- , NH_4^+ , NH_4NO_3) nevelt növényekben. Búza gyökerében egy GSSG-függő izoformát sikerült azonosítani, melynek aktivitása eltért a különböző kezeléseknél (14. ábra). Dalal és Khanna-Chopra (2001) búzahibridek vizsgálata során natív gélelektroforézissel két GSSG-függő izoformát különített el.

A SOD enzimnek növényekben több izoformája ismert. Ezeket először Baum és Scandalios (1979) mutatta ki. Az izoformák jól elválaszthatók natív PAGE segítségével. Az egyes izoformák (Cu/Zn, Fe, Mn SOD) KCN-ra és H_2O_2 -ra különböző érzékenységgel reagálnak, így könnyen elkülöníthetők.

Kísérletünkben gyökérben 6 izoformát különítettünk el, míg ezekből 3 a levélben is kimutatható (15. ábra). A legtöbb, eddig vizsgált növényben sikerrel azonosítottak SOD izoenzimeket, így búzában is (Dalal és Khanna-Chopra, 2001). A búzában azonosított négy izoforma közül egy Mn SOD, a többi Cu/Zn SOD volt. Az általunk végzett kísérletekben is egy Mn SOD izoformát sikerült azonosítani. Az enzim aktivitásában só (NaCl) stressz hatására bekövetkező változásokról már több publikáció is beszámolt (Shalata és Tal, 1998; Hernández és mtsai, 1999), de keveset tudunk a különböző stresszhatásoknak az izoenzimekre gyakorolt hatásáról.

A SOD és a GR esetében jelentkező eltérő kezelések okozta izoforma változás magyarázatául szolgálhat, hogy a különböző formák a különböző folyamatok során felszabadult szabadgyökök semlegesítéséért felelősek. Az eltérő stresszhatások okozta anyagcsereváltozások befolyásolhatják a szabadgyökképződést, eltolhatják az egyensúlyi arányokat, így hatással lehetnek az egyes izoformák aktivitására. Az is lehetséges, hogy bizonyos izoformákat a sejten belüli környezet megváltozása (pH, ionkoncentráció)

indukálja, hamarabb, mint a változások következményeként fellépő nagyobb mennyiségű szabadgyök felszabadulás.

A kataláz egy H_2O_2 -ot semlegesítő enzim. A H_2O_2 könnyen átdiffundál a különböző membránokon, és ezáltal válhat veszélyessé a keletkezés helyétől távolabb is. Semlegesítésében a kataláz mellett peroxidázok is részt vesznek. Mind a kataláznak, mind pedig a peroxidázoknak több izoformáját azonosították kukoricában (Scandalios, 1965, 1968), napraforgóban (Eising és mtsai, 1989) és paradicsomban (Gianinetti és mtsai, 1993) is. Sóstressz (NaCl) hatására az enzimek aktivitásában változást mutattak ki (Lechno és mtsai, 1997; Shalata és Tal, 1998; Dionisio-Sese és Tobita, 1998).

A mi kísérleti rendszerünkben natív PAGE segítségével 2 kataláz izoformát sikerült azonosítani (16. ábra). Ebből gyökérben egy, míg a levélben mindkét forma jelen volt. Dalal és Khanna-Chopra (2001) egy kataláz izoformát határozott meg búza levélben. A különböző izoformák eltérő viselkedését mutatták ki különböző kezelések hatására kukoricában (Scandalios és mtsai, 1997). Az aktivitások eltérnek kezelésenként, míg az izoformák állandóak voltak. Láthatóan a só, mint stressztényező erős enzimaktivitás növelő hatású. Transzgénikus Cat-1 hiányos dohány növényekkel folytatott vizsgálatok rámutattak, hogy a Cat-1 szükséges az aszkorbát és glutation készletek oxidációjának megakadályozásához, és ezzel együtt a sejt redox egyensúlyának fenntartásához (Willekens és mtsai, 1997).

A guajakol peroxidáz esetében több izoformát sikerült elkülönítenünk mind a levélben, mind pedig a gyökérben. Az irodalomban találtunk példát több peroxidáz izoforma elkülönítésére búza növényben (Dalal és Khanna-Chopra, 2001). A különböző peroxidázok szerepének feltárása komplikált feladat, mivel többféle élettani folyamathoz csatolható a működésük. Jyoti és mtsai (1998) különböző sókezelés esetén eltérő peroxidáz izoenzim mintázatot találtak. Kísérleteinkben a különböző kezelések eredményeképpen aktivitásváltozást tudtunk megfigyelni. Ez, a korábban említett enzimekhez hasonlóan, a só (NaCl) és ammóniumion aktivitást növelő hatását mutattja.

Az eredményekből megállapítható az, amit a kukoricán és napraforgón végzett kísérletek értékelésénél elmondtunk, hogy a NaCl kezelés hatásához hasonló változások kiváltására képes az ammónium ion, tehát stressz-szignálként szolgálhat, amely néhány – a korai stressz-adaptációs folyamatokért felelős – enzim aktivációját indukálja. Egyes

enzimek, mint a GPx és Kat aktivitásváltozással, míg mások (GR, SOD) új izoforma megjelenésével válaszolnak.

6.3. Az antioxidáns enzimek működésének statisztikai összehasonlítása sókezelt (100 mM NaCl) növényekben

Az általunk végzett kísérletek eredményeit összegyűjtöttük, és matematikai elemzésnek vetettük alá. Célunk az volt, hogy a sóstressz hatására bekövetkező antioxidáns válaszmechanizmusok enzimatisz elemei közötti kapcsolódási pontokat feltárjuk.

Nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző enzimek sókezelésre adott válaszaiban (relatív enzimaktivitás), ami kifejezheti azt, hogy a kezelés minden esetben stresszfaktorként, szolgál az enzim számára. Az antioxidáns védekezőrendszer egy komplex rendszer, melynek elemei együttesen védik a növényt a szabad gyökök roncsoló hatásaival szemben. Ezt támasztják alá azok a transzgénikus növényekkel végzett kísérletek, melyek során - pl. a GR (Foyer és mtsai, 1991) és SOD (Tepperman és Dunsmuir, 1990) esetében – kimutatták, hogy az antioxidáns rendszer egyetlen elemének túltermeltetése csekély hatással jár, és nem képes kellő hatékonyságú védelmet biztosítani a sejtben zajló oxidációs folyamatok következményei ellen (Foyer és mtsai, 1991).

A korrelációanalízis során a sóstressz hatására adott válasz hasonlóságát vizsgálhatjuk az egyes enzimek aktivitásváltozásában. Korrelációt ($P < 0,05$) kizárólag a SOD és GR enzimek esetében találtunk. Erre magyarázatot adhat a két enzim működésének összefonódása a aszkorbinsav-glutation cikluson keresztül. Az enzimek válaszreakcióit elindító, befolyásoló folyamatok azonosságáról, vagy különbözőségéről információt nyújthat a főkomponens-analízis (18. ábra). Az ábrán jól elkülöníthető a GR, SOD, GST alkotta csoport, melyek viselkedését azonos tényező alakítja, míg a Kat és GPx enzimek meghatározottsága eltér. Az eredmények összhangban vannak az egyes enzimek működéséről alkotott ismereteinkkel. A SOD, GR és GST enzimek az oxidatív stressz kiküszöbölésére saját feladatukat végzik. A SOD a szuperoxid gyökaniont semlegesíti, a GR kulcsszerepet játszik az aszkorbinsav-glutation ciklusban, míg a GST a lipidperoxidáció sejtromboló hatása ellen véd. Ellenben a Kat és GPx enzimek esetében olyan enzimekről van szó, melyeknél a feladat ugyanaz. Azonos feladaton osztoznak, mégpedig a hidrogén peroxid semlegesítésén. Annak ellenére, hogy a feladat azonos, a két enzim különböző módon látja el feladatát.

Az antioxidáns védekezőrendszer minél több elemére kiterjedő vizsgálatok matematikai összegzése nyithat új lehetőségeket e rendszer működésének megértéséhez. Például az ökológia vagy éppen a meteorológia területein már bevált a komputer szimuláció, mely a folyamatok könnyebb áttekinthetőségét teszi lehetővé. Polle (2001) munkájában az anyagcsere modellezést használja a SOD-aszkorbát-glutation rendszer működésének vizsgálatához, és megállapítja, hogy a modellszerű megközelítés hozzájárulhat az antioxidáns védekezőrendszer működésének megértéséhez, és hasznos információkat szolgáltat a jobb stresszrezisztenciával rendelkező növények nemesítési stratégiájának kidolgozásához.

6.4. Aldehid oxidáz enzim jelenlétének vizsgálata kukorica gyökér mitokondriumban és peroxiszómában

A 19., 20. és 21. ábrákon végigtekintve munkánk eredményéről a következőket mondhatjuk el: Az általunk választott módszer megfelelő mitokondrium és peroxiszóma kukorica gyökérből való kitisztítására. A sejtalkotók közötti keresztszennyeződés alacsony százaléka (<10%) megfelel az irodalmi adatoknak (Volkita, 1991; Jimenez és mtsai, 1998). A gélfestés során a kitisztított sejtalkotókban AO enzim aktivitását nem tudtuk kimutatni. Erre az eredményre többféle magyarázat is adható: az enzim nincs jelen ezekben sejtalkotókban. Vizsgálatainkban a peroxiszómák intaktsága 30-50% között volt, míg ez az érték az irodalomban 65-75%. (Volkita, 1991; Jimenez és mtsai, 1998). Elképzelhető, hogy annak ellenére, hogy az enzim esetleg jelen volt, kiszivárgott a sérült sejtalkotóból. Erre utalhat az utolsó frakcióban kimutatható aktivitás, mely az elválasztó gradiens oszlop tetejéről származik, törött részecskéket tartalmaz.

A mi eredményeink is azt támasztják alá, hogy az enzim kukoricában is a citoszolban található.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Napjainkban a növényélettani kutatásoknak jelentős részét a stresszkutatások teszik ki. Ez magyarázható egyrészt a bioszférában bekövetkező változásokkal, másrészt azzal, hogy a növények válaszmechanizmusai, illetve az, hogy hogyan alkalmazkodnak a különböző stressz körülményekhez, még nem teljesen ismert. A vizsgálatok intenzív és széleskörű elterjedéséhez gazdasági tényezők is hozzájárulnak, hiszen a kedvezőtlen körülmények a haszonnövényeknél tetemes minőségi és mennyiségi veszteséget okoznak évente, és ez az élelmiszerellátásban gondokhoz vezethet.

Minden stresszhatásnak van oxidatív komponense, így a növények az őket érő külső hatásokon keresztül egyfajta oxidatív stressznek is ki vannak téve. Ez szabad gyökök és aktivált oxigén tartalmú molekulák koncentrációjának növekedésében nyilvánul meg. Ezen hatások kivédésére egy összetett, enzimatis és nem enzimatis elemekből felépülő antioxidatív védekezőrendszer épült ki. A külső környezet változásainak hatása jól mérhető ezen rendszer enzimatis elemeinek aktivitásán keresztül, és ezen vizsgálatok segítségével feltárható a növény érzékenysége adott stresszfaktorra, illetve annak növényre gyakorolt hatása. Mivel a sókezelést (NaCl) követően szintén megnő az aktivált oxigénszármazékok koncentrációja, a sóstressz hatását az antioxidáns védekezőrendszer enzimatis elemein keresztül vizsgáltuk.

Munkánk során célul tűztük ki az antioxidáns védekezőrendszer mind jobb megismerését. A korábbi eredmények ismeretében a következő vizsgálatokat végeztük:

A glutation reduktáz enzim aktivitásán keresztül vizsgáltuk, jelen van-e egyfajta napi ritmus az enzimatis védekezőrendszerben. Kísérleteinkben arra is a választ kerestünk, hogyha ez a ritmus jelen van az enzim aktivitásában, a különböző mértékű NaCl kezelés megváltoztatja-e a jellemzőit.

Külső környezeti hatások közül a só mellett a különböző nitrogénforrások (nitrát, ammónium) hatását vizsgáltuk a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, kataláz és glutation-S-transzferáz enzimeken keresztül. Arra kerestünk választ, hogy miként hatnak ezek a tényezők a védekezőrendszer aktivitására, illetve egymásra. Ezek megválaszolására vizsgáltuk az enzimek aktivitásának változását, illetve izoenzimeik jelenlétét különböző körülmények között nevelt növényekben.

Az aldehid oxidáz enzim, bár nem antioxidáns, az utóbbi években bekerült a stresszhatásokkal foglalkozó kutatások körébe. Ennek magyarázatául szolgálhat, hogy napjainkban mind több, stresszválaszhoz köthető funkcióját tárták fel, és többek között két fitohormon – az abszcizinsav és az indol-3-ecetsav – bioszintézisének utolsó lépését katalizálja. Mivel folyamatosan újabb és újabb információk jelennek meg az enzimmel kapcsolatban, ezért sejten belüli lokalizációját vizsgáltuk, annak reményében, hogy sikerül az enzimet azonosítanunk kukorica gyökér mitokondriumban vagy peroxiszómában.

A kísérletek során növényeinket folyadékkultúrában neveltük, amely megkönnyítette a különböző kezelések (50, 100, 150 mM NaCl), illetve az eltérő nitrogénforrások (NO_3^- , NH_4NO_3 , NH_4^+), hatásának vizsgálatát. Vizsgálatainkban a mezőgazdasági termelés szempontjából fontos növényeket - búza, kukorica és napraforgó - használtunk kísérleti objektumként. A növényeknek mind a levelét, mind pedig a gyökerét használtuk kísérleteink során. Az enzimaktivitás nyomonkövetéséhez fotometriás méréseket alkalmaztunk, míg az enzimek izoformáinak elkülönítése natív poliakrilamid gélelektroforézissel történt. A sejtalkotók (mitokondrium, peroxiszóma) elválasztása során lineáris cukorgradienst használtunk.

Az általunk elvégzett vizsgálatok a következő eredményekre vezettek:

- A glutation reduktáz enzim aktivitása napi ritmus szerint változik, melynek periódusideje 15 és 20 óra között van. A napiritmus mellett rövidebb periódusidejű, úgynevezett ultradián ritmust tudtunk azonosítani. Megfigyeléseink szerint a GR aktivitásában megfigyelt ritmus közvetlenül nem fény által szabályozott, mivel a változások mind levélben, mind pedig gyökérben már a sötét periódus vége előtt elindultak.

- Sókezelés (NaCl) hatására megnőtt a glutation reduktáz enzim aktivitása. A sókezelés nem érintette a ritmus periódusidejét, csak az amplitúdóját. Ez azt sugallja, hogy a sóstressz a feltételezett ritmusképző kimeneti oldalán fejt ki hatását. Az általunk azonosított ultradián ritmus a sókezelésre érzékenynek mutatkozott.

- A sókezelésen kívül a különböző nitrogénforrások milyensége is hatással van az antioxidatív védekezőrendszer enzimatiszus elemeire. Változásokat tapasztaltunk a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz, guajakol peroxidáz, kataláz, és glutation-S-transzferáz enzimek aktivitásában, mind pedig a glutation reduktáz, szuperoxid dizmutáz,

guajakol peroxidáz, izoenzim összetételében. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az ammónium ion stressz-szignálként szolgálhat, amely néhány – a korai stressz-adaptációs folyamatokért felelős – enzimek aktivációját indukálja.

Az egyes gyökérrégiók vizsgálatakor megállapítottuk, hogy a különböző kezelések antioxidáns enzimekre gyakorolt hatása eltér a gyökér csúcsi régiójában a teljes gyökérben tapasztaltaktól. Mindez arra utal, hogy az élő szervezetekben zajló folyamatok érzékenysége eltérő.

- Az aldehid oxidáz enzim sejten belüli lokalizációjának vizsgálatának eredményeiből megállapítható, hogy az enzim kukoricában is a citoszolban található.

A munkánk során kapott eredmények további részletekkel egészítik ki az antioxidáns védekezőrendszerrel kapcsolatos ismereteket. Mindezek hozzájárulnak a növényi védekező mechanizmusok működésének jobb megértéséhez. Az ezirányú kutatások távolabbi célja az, hogy a nemesítők számára olyan információkkal szolgáljon, melyek segítségükre lehetnek a jobb stressz rezisztenciával rendelkező fajták előállításához szükséges nemesítési stratégiák kidolgozásához.

8. SUMMARY

Nowadays a substantial proportion of plant physiology research is made up of stress research. This is due partly to the changes occurring in the biosphere and partly to the fact that the response mechanisms of the plants, i.e. how they adapt to various stress conditions, have not yet been fully clarified. Economic factors are also responsible for the intensive spread of such investigations, since unfavourable conditions cause great qualitative and quantitative losses in agricultural crops, leading to food supply problems.

All stress effects have an oxidative component, so plants are exposed to oxidative stress through the external factors influencing them. This is manifested in an increase in the concentration of free radicals and oxygen-containing reactive molecules. A complex antioxidative system consisting of enzymatic and non-enzymatic elements has developed to provide protection against these effects. The effect of changes in the external environment can be efficiently measured through the activity of the enzymatic components of this system and these measurements can be used to determine the sensitivity of the plant to the given stress factor, and the effect of the stress factor on the plant. Since the concentration of active oxygen species also rises after saline (NaCl) treatment, we studied the effect of salt stress through the enzymatic components of the antioxidant defence system.

We had the goal to know more about the antioxidant defence system. Using the preliminary data of the literature the following experiments were thus carried out:

The activity of the glutathione reductase enzyme was examined in order to determine whether a diurnal rhythm could be detected in the enzymatic defence system, and whether this was altered by treatment with various concentrations of NaCl.

Among the external environmental factors, in addition to salt, the effect of various nitrogen sources (nitrate, ammonium) was also tested through the glutathione reductase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase enzymes in order to determine how these factors affected the activity of the defence system and whether they strengthened or weakened each other's effects. To this end, changes in enzyme activity and the presence of isoenzymes were investigated in plants grown under different conditions.

Although it is not an antioxidant, the aldehyde oxidase enzyme has also been investigated in recent years in research on stress effects, since it has been shown to have a number of functions linked to stress responses, and had been implicated in the synthesis of two important phytohormones indole acetic acid and abscisic acid. Since more and more information is being published on this enzyme, examinations were made on its localisation within the cell in the hope of isolating it in the mitochondria or peroxisomes of maize roots.

In the course of the experiments plants were raised in liquid culture, which facilitated studies on the effect of various treatments (50, 100, 150 mM NaCl) and nitrogen sources (NO_3 , NH_4NO_3 , NH_4). Plants which has agricultural importance, wheat, maize and sunflower were used in the studies. We used both of the roots and leaves during the analyzes. To determine the changes of the enzyme activity spectrophotometric measurements while to separate and examine the different isoforms native polyacrylamide gel electrophoresis were used. Among the cell components, mitochondria and peroxysomes were extracted from maize roots using a linear sugar gradient.

The following results were obtained in the experiments:

- The activity of the glutathione reductase enzyme changed according to a diurnal rhythm, the period of which was between 15 and 20 hours. Beside the diurnal rhythm we were able to detect an ultradian rhythm with a shorter period.
- Salt treatment (NaCl) led to an increase in the activity of the glutathione reductase enzyme, but no linear correlation was found between the salt concentrations (50, 100, 150 mM NaCl) and the change in enzyme activity. The salt treatment did not effect the period time of the diurnal rhythm, but there was a change in the amplitude. The ultradian rhythm was sensitive to salt treatment.
- The enzymatic components of the antioxidative defence system were influenced not only by salt treatment, but also on the type of nitrogen source. Changes were observed in the activity of the glutathione reductase, superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, catalase and glutathione-S-transferase enzymes and in the isoenzyme compositions of glutathione reductase, superoxide dismutase, guayacol peroxidase and catalase. It was concluded from the results that the ammonium ion may serve as a stress signal responsible for activation of enzymes responsible for a number of early stress adaptation processes.

During the analyses of the distinct root zones different effects of the several treatments were observed on the antioxidant enzymes in the tip than in the whole root. The different sensitivity of the metabolic processes can give a possible explanation for the phenomenon.

- Examinations on the localisation of the aldehyde oxidase enzyme within the cell showed it to be located in the cytosol.

The results of our study amplify the knowledge about the antioxidant defence system and conduce to a better understanding of the working mechanisms of the plant defence systems. The farther goal of this kind of researches is to provide additional information that is useful to develop breeding strategies for higher stress resistance in plants.

9. IRODALOMJEGYZÉK

- Anderson, J. V., Chevone, B. I. and Hess, J. L. (1992): Seasonal variation in the antioxidant system of eastern white pine needles. *Plant Physiol.* 98: 501-508.
- Akaba, S., Kawakami, N., Leydecker, M.-T., Moureaux, T. and Koshiba, T. (1997): Purification and properties of aldehyde oxidase from *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol.* 114S: 153.
- Barabás, N. K., Szegletes, Zs., Pestenács, A., Fülöp, K. and Erdei, L. (1998): Effects of excess UV-B irradiation on the antioxidant defence mechanisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *J. Plant Physiol.* 153: 146-153.
- Barabás, N. K., Omarov, R. T., Erdei, L. and Lips S. H. (2000): Distribution of the Moenzymes aldehyde oxidase, xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in maize (*Zea mays* L.) nodal roots as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.* 155: 49-58.
- Bauer, S. L. and Howard, P. C. (1991): Kinetics and cofactor requirements for the nitroreductive metabolism of 1-nitropyrene and 3-nitrofluoranthene by rabbit liver aldehyde oxidase. *Carcinogenesis* 12: 1545-1549.
- Baum, J. A. and Scandalios, J. G. (1979): Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize. *Differentiation* 13: 133-140.
- Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971): Superoxide dismutase improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44: 276-287.
- Beckman, K. B. and Ames B. N. (1997): Oxidants, antioxidants and aging. In: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. J. G. Scandalios (ed.) pp. 201-246. Cold Spring Laboratory Press, New York, USA, ISBN 0-87969-502-1.
- Beevers, H. (1979): Microbodies in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30: 159-193.
- Bendixen, R., Gerendás, J., Schinner, K., Sattelmacher, B. and Hansen, U. P. (2001): Difference in zeaxanthin formation in nitrate- and ammoniumgrown *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.* 111: 255-261.
- Bielawski, W. and Joy, K. W. (1986): Properties of glutathione reductase from chloroplasts and roots of peas. *Phytochem.* 25: 2261-2265.
- Boyer, J. S. (1982): Plant productivity and environment. *Sci.* 218: 443-448.
- Bowler, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1992): Superoxid dismutase and stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.

- Bowler, C., Van Camp, W., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1994): Superoxide dismutase in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13(3): 199-218.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Breusegem, F. V., Vranová, E., Dat, J. F., Inzé, D. (2001): The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci.* 161: 405-414.
- Bueno, P., Varela, J., Giménez-Gallego, G. and del Río, L. A. (1995): Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. *Plant Physiol.* 108: 1151-1160.
- Canedas, E. (1989): Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Colepiccolo, O., Camarero, V. C. P. C. and Hastings, J. W. (1991): A circadian rhythm in the activity of superoxide dismutase in the photosynthetic algae *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiol. Int.* 9: 266-268.
- Cramer, G. R., Läuchli, A. and Polito, V. S. (1985): Displacement of Ca^{2+} by Na^{+} from the plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiol.* 79, 207-211.
- Cramer, M. D. and Lewis, O. A. M. (1993): The influence of NO_3^- and NH_4^+ nutrition on the carbon and nitrogen partitioning characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants. *Plant Soil* 154: 289-300.
- Cramer, M. D., Schierholt, A., Wang, Y. Z. and Lips, S. H. (1995): The influence of salinity on the utilization of root anaplerotic carbon and nitrogen metabolism in tomato seedlings. *J. Exp. Bot.* 46: 1569-1577.
- Dalal, M. and Khanna-Chopra, R. (2001): Differential response of antioxidant enzymes in leaves of necrotic wheat hybrids and their parents. *Physiol. Plant.* 111: 297-304.
- Dean, V. J., Gronwald, J. W. and Eberlein, C. V. (1990): Induction of glutathione-S-transferase isozymes by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* 92: 467-473.
- De Kok, L. J. and Oosterhuis, F. A. (1983): Effects of frost-hardening and salinity on glutathione and sulfhydryl levels and on glutathione reductase activity in spinach leaves. *Physiol. Plant.* 58: 47-51.
- Dionisio-Sese, M. L. and Tobita, S. (1998): Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. *Plant Sci.* 135: 1-9.
- Edwards, E. A., Enard, C., Creissen, G. P. and Mullineaux, P. M. (1994): Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed peas. *Planta* 192: 137-143.

- Elstner, E. F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33: 73-96.
- Eising, R., Trelease, R. and Ni, W. (1989): Biogenesis of catalase in glyoxisomes and leaf-type peroxisomes of sunflower cotyledons. *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 258-264.
- Erdei, L., Møller, I. M. és Jensén, P. (1989): The effects of energy supply and growth regulation on K⁺ uptake into plant roots. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 184: 345-361.
- Erdei, L., Trivedi, S., Takeda, K. and Matsumoto, H. (1990): Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *J. Plant Physiol.* 137: 165-168.
- Erdei, L. és Taleisnik, E. (1993): Changes in water relation parameters under osmotic and salt stresses in maize and sorghum. *Physiol. Plant.* 89: 381-387.
- Erdei, L., Szegletes, Zs., Barabás, N. K., Pestenács, A., Fülöp, K., Kalmár, L., Kovács, A., Tóth, B. and Dér, A. (1998): Environmental stress and the biological clock in plants: changes of rhythmic behavior of carbohydrates, antioxidant enzymes and stomatal resistance by salinity. *J. Plant Physiol.* 152: 265-271.
- Fadzilla, N. M., Finch, R. P. and Roy, H. B. (1997): Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *J. Exp. Bot.* 48: 325-331.
- Fehér, J. and Vereckei, A. (1985): Szabadgyök-reakciók jelentősége az orvostudományban. Medicina Könyvkiadó, Budapest.
- Fieldes, M. A. (1992): Using Coomassie Blue to stabilize H₂O₂-guaiacol stained peroxidases on polyacrylamid gels. *Electrophoresis* 13: 454-455.
- Finlayson, S. A., Lee, I.-J. and Morgan, P. W. (1998): Phytochrome B and regulation of circadian ethylene production in sorghum. *Plant Physiol.* 116: 17-25.
- Foyer, H. C., Lelandais, M., Galap, C. and Kunert, K. J. (1991): Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol.* 97: 863-872.
- Foyer, H. C., Lelandais, M. and Kunert, K. J. (1994a): Photooxidative stress in plants. *Physiol. Plant.* 92: 696-717.
- Foyer, H. C., Descourvières P. and Kunert, K. J. (1994b): Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.* 17: 507-523.
- Foyer, H. C. and Mullineaux, P. M. (1994): Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC Press, Boca Raton.

- Fowler, T., Lucas, C. and Gossett, D. (1997): Glutathione-S-transferase isozymes in control and salt-adapted cotton callus. Proceedings Beltwide Cotton Conferences. Memphis: National Cotton Council 2, 1377-1379.
- Fridovich, I. (1986): Superoxide dismutases. Adv. Enzymol. 58: 62-97.
- Fukuda, M., Hasezawa, S., Asai, N., Nakajima, N. and Kondo, N. (1998): Dynamic organization of microtubules in guard cells of *Vicia faba* L. with diurnal cycle. Plant Cell Physiol. 39: 80-86.
- Gianinetti, A., Cantoni, M., Lorenzoni, C., Salamini, F. and Marocco, A. (1993): Altered levels of antioxidant enzymes associated with two mutations in tomato. Physiol. Plant. 89: 157-164.
- Golden, S. S., Ishiura, M., Johnson, C. H. and Kondo, T. (1997): Cyanobacterial circadian rhythms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48: 327-354.
- Greenway, H. and Munns, R. (1980): Mechanism of salt tolerance in nonhalophytes. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 149-190.
- Gressel, J. and Galun, E. (1994): Genetic controls of photooxidant tolerance. In: Foyer, C. H. and Mullineaux, P. M. (eds.): Causes of Photo-Oxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants, pp. 237-274. CRC Press, Boca Raton.
- Guy, C. L. and Carter J. V. (1984): Characterization of partially purified glutathione reductase from cold-hardened and nonhardened spinach leaf tissue. Cryobiol. 21: 454-464.
- Hall, J. C. (1995): Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. Trends Neurosci. 18: 230-240.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E. and Kere, J. (1982): Association of enhanced peroxidase activity in induced systemic resistance of cucumber to *Colettotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol. 20: 73-82.
- Hausladen, A. and Alscher, R. G. (1994): Purification and characterization of glutathione reductase isozymes specific for the state of cold hardiness of red spruce. Plant Physiol. 105: 205-213.
- Hawkins, H. J. and Lewis, O. A. M. (1993a): Combination effect of NaCl salinity, nitrogen form and calcium concentration on the growth, ionic content and gaseous exchange properties of *Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos. New Phytol. 124: 161-170.
- Hawkins, H. J. and Lewis, O. A. M. (1993b): Effect of NaCl salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in *Triticum aestivum* L. cv. Gamtoos. New Phytol. 124: 171-177.

- Hegedűs, A., Erdei, S. and Horváth, G. (2001): Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Sci.* 160: 1085-1093.
- Hernández, J. A., Corpas, F. J., Gómez, M., del Río, L. A. and Sevilla F. (1993): Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species. *Physiol. Plant.* 89: 103-110.
- Hernández, J. A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. J. and Sevilla F. (1999): Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *New Phytol.* 141: 241-251.
- Herppich, M., von Willert, D. J. and Herppich, W. B. (1995): Diurnal rhythm in citric acid content preceded the onset of night-time malic acid accumulation during metabolic changes from C₃ to CAM in salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.* 147: 38-42.
- Hilal, M., Zenoff, A. M., Ponessa, G., Moreno, H. and Massa, E. M. (1998): Saline stress alters temporal patterns of xylem differentiation and alternative oxidase expression in developing soybean roots. *Plant Physiol.* 117: 695-701.
- Homblé, F. (1996): Membrane transport and oscillations in plants. In: Vanden Driessche, T., Guisset, J.-L. and Petiau-de Vries, G. M. (eds.): *Membranes and circadian rhythms*, pp. 125-138. Springer Verlag, Berlin.
- Huffaker, R. C. and Rains, D. W. (1986): N use efficiency as influenced by S assimilation in barley exposed to salinity. In: Letey, J. (ed.): *Soil and plant interaction with salinity. Kearney Foundation Five Year Report 1980-1985*, pp. 33-38. University of California, Berkeley: Division of Agriculture and Natural Resources.
- Ievinsh, G. and Kreicbergs, O. (1992): Endogenous rhythmicity of ethylene production in growing intact cereal seedlings. *Plant Physiol.* 100: 1389-1391.
- Inzé, D. and Van Montagu, M. (1995): Oxidative stress in plants. *Cur. Opin. Biotech.* 6: 153-158.
- Ishikawa, H. and Evans, M. L. (1995): Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725-727.
- Janda, T., Szalai, G., Tari, I. and Páldi, E. (1999): Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Planta* 208: 175-180.

- Jiang, F., Hellmann, U., Sroga, G. E., Bergman, B. and Mannervik, B. (1995): Cloning, sequencing, and regulation of the glutathione reductase gene from the cyanobacterium *Anabaena* PCC 7120. *J. Biol. Chem.* 270: 22882-22889.
- Jimenez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Río, L. A. and Sevilla F. (1998): Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant Physiol.* 118: 1327-1335.
- Jouve, L., Greppin, H. and Agosti, R. D. (1998): *Arabidopsis thaliana* floral stem elongation: evidence for an endogenous circadian rhythm. *Plant Physiol. Biochem.* 36: 469-472.
- Jyoti, S., Swarnkar, P. L. and Soni, J. (1998): Isozymic variations in *Vigna aconitifolia* under salinity stress. *J. Phyt. Res.* 11: 179-181.
- Kende, H. and Zeevaart, J. A. D. (1997): The five 'classical' plant hormones. *The Plant Cell* 9: 1197-1210.
- Kocsy, G., Owtrim, G., Brander, K. and Brunold, Ch. (1997): Effects of chilling on the diurnal rhythm of enzymes involved in protection against oxidative stress in a chilling-tolerant and a chilling-sensitive maize genotype. *Physiol. Plant.* 99: 249-254.
- Koshiba, T., Saito, E., Ono, N., Yamamoto, N. and Sato, M. (1996): Purification and properties of flavin- and molybdenum-containing aldehyde oxidase from coleoptiles of maize. *Plant Physiol.* 110: 781-789.
- Koukkari, W. L., Bingham, C., Hobbs, J. D. and Duke, S. H. (1997): In search of biological hour. *J. Plant Physiol.* 151: 352-357.
- Läuchli, A. (1990): Calcium, salinity and the plasma membrane. In: Leonard, R. T. and Hepler, P. K. (eds.): *Current topics in plant physiology*, pp. 26-35. Maryland, USA: American Society of Plant Physiologists 4.
- Lechno, S., Zamski, E. and Tel-Or, E. (1997): Salt stress-induced responses in cucumber plants. *J. Plant Physiol.* 150: 206-211.
- Leckie, C. P., McAinsh, M. R., Montgomery, L., Priestley, A. J., Staxen, I., Webb, A. A. R. and Hetherington, A. M. (1998): Second messengers in guard cells. *J. Exp. Bot.* 49: 339-49.
- Leydecker, M. T., Moureaux, T., Kraepiel, Y., Schnorr, K. and Caboche, M. (1995): Molybdenum cofactor mutants, specifically impaired in xanthine dehydrogenase activity and abscisic acid biosynthesis, simultaneously overexpress nitrate reductase. *Plant Physiol.* 107: 1427-1431.

- Levi, L. (1997): Stress – spice of life or kiss of death? Abstracts of 'Stress of Life. Stress and adaptation from molecules to man' Congress, Budapest, Hungary, p.200.
- Lewis, O. A. M. and Chadwick, S. (1983): An ^{15}N investigation into nitrogen assimilation in hydroponically-grown barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Clipper) in response to nitrate, ammonium and mixed nitrate and ammonium nutrition. *New Phytol.* 95: 635-646.
- Lewis, O. A. M. (1986): The processing of inorganic nitrogen by the plant. In: *Plants and nitrogen*, pp. 21-41. London: Edward Arnold Publishers Ltd.
- Lewis, O. A. M., Leidi, E. O. and Lips, S. H. (1989): Effect of nitrogen source on growth response to salinity stress in maize and wheat. *New Phytol.* 111: 155-160.
- Lichtenthaler, H. K. (1996): Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148: 4-14.
- Lips, S. H., Leidi, E. O., Silberbush, M., Soares, M. I. M. and Lewis, O. A. M. (1990): Physiological aspects of ammonium and nitrate fertilization. *J. Plant Nutr.* 13: 1271-1289.
- Mannervik, B. and Guthenberg, C. (1981): Glutathione transferase (Human placenta). *Methods in Enzymol.* 77: 231-235.
- Mauch, F. and Dudler, R. (1993): Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol.* 102: 1193-1201.
- McClung, C. R. (2001): Circadian rhythms in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 139-162.
- Mendel, R., R. and Schwarz, G. (1999): Molybdoenzymes and molybdenum cofactor in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 33-69.
- Meneguzzo, S., Navarri-Izzo, F. and Izzo, R. (1999): Antioxidative responses of shoots and roots of wheat to increasing NaCl concentrations. *J. Plant Physiol.* 155: 274-280.
- Meyer, R. C., Goldsbrough, P. B. and Woodson, W. K. (1991): An ethylene-responsive flower senescence-related gene from carnation encodes a protein homologous to glutathione S-transferase. *Plant Mol. Biol.* 17: 277-281.
- Mitsuko, A., Akihiro, K., Hikaru, S., Toshiki, N., Kiyoshi, T. and Noriaki, K. (1991): Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *Eschericia coli*. *Plant Cell Physiol.* 32: 691-697.

- Monk, L. S., Fagerstedt, K. V. and Crawford, R. M. (1989): Oxygen toxicity and superoxide dismutase as an antioxidant in physiological stress. *Physiol. Plant.* 76: 456-459.
- Njus, D., Sulzman, F. M. and Hastings, J. W. (1974): Membrane model for the circadian clock. *Nature* 248: 116-120.
- Noctor, G. and Foyer, C. (1998): Ascorbate and glutathione keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49: 249-279.
- Omarov, R. T., Sagi, M. and Lips, S. H. (1998): Regulation of aldehyde oxidase and nitrate reductase in roots of barley (*Hordeum vulgare* L.) by nitrogen source and salinity. *J. Exp. Bot.* 49: 897-902.
- Omarov, R. T., Akaba, S., Koshiba, T. and Lips, S. H. (1999): Aldehyde oxidase in roots, leaves and seeds of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 50: 63-69.
- Panagopoulos, I., Bornman, J. F. and Bjorn, L. O. (1990): Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. *J. Photochem. Photobiol.* 8: 73-87.
- Peterson-Mahrt, S. K., Ekelund, N. G. A. and Widell, S. (1994): Influence of UV-B radiation and nitrogen starvation on daily rhythms in phototaxis and cell shape of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 92: 501-505.
- Peterson-Mahrt, S. K., Ekelund, N. G. A. and Widell, S. (1995): Effects of UV-B radiation and nitrogen starvation on enzyme activities in isolated plasma membranes of *Euglena gracilis*. *Physiol. Plant.* 95: 515-522.
- Peuke, A. D., Jeschke, W. D. and Hartung, W. (1994): The uptake and flow of C, N and ions between roots and shoots in *Ricinus communis* L. III. Long-distance transport of abscisic acid depending on nitrogen nutrition and salt stress. *J. Exp. Bot.* 45: 741-747.
- Piechulla, B. (1993): "Circadian clock" directs the expression of plant genes. *Plant Molec. Biol.* 22: 533-542.
- Polle, A., Otter, T. and Mehne-Jakobs, B. (1994): Effect of magnesium-deficiency on antioxidative systems in needles of Norway spruce [*Picea abies* (L.) Karst.] grown with different ratios of nitrate and ammonium as nitrogen sources. *New Phytol.* 128: 621-628.
- Polle, A. (2001): Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplast by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.

- Rao, M. V., Paliyath, G. and Ormrod, D. P. (1996): Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 110: 125-136.
- Redinbaugh, M., Sabre, M. and Scandalios, J. G. (1990): Expression of the maize Cat3 catalase gene under the influence of a circadian rhythm. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 87: 6853-6857.
- Rodríguez-Rosales, M. P., Kerkeb, L., Bueno, P. and Donaire, J. P. (1999): Changes induced by NaCl in lipid content and composition, lipoxygenase, plasma membrane H⁺-ATPase and antioxidant enzyme activities of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) calli. *Plant Sci.* 143: 143-150.
- Roenneberg, T. (1996): The complex circadian system of *Gonyaulax polyedra*. *Physiol. Plant.* 96: 733-737.
- Rothe, G. M. (1975): Intracellular localization and some properties of two aldehyde oxidase isoenzymes (EC 1.2.3.1) in potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem. Physiol. Pflanzen* 167: 411-418.
- Sagi, M., Omarov, R. T. and Herman, S. H. (1998): The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci.* 135: 125-135.
- Scandalios, J. G. (1965): Subunit dissociation and recombination of catalase isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 53: 1035-1040.
- Scandalios, J. G. (1968): Genetic control of multiple molecular forms of catalase in maize. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 151: 274-293.
- Scandalios, J. G., Guan, L. and Polidoros, A. N. (1997): Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression. In: Scandalios, J. G. (ed.): *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, pp. 343-406. CSHL Press, New York.
- Schroeder, J. I., Allen, G. J., Hugouvieux, V., Kwak, J. M. and Waner, D. (2001): Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52: 627-658.
- Schwartz, S. H., Kloosterziel, K. M., Koorneef, M. and Zeevaart, J. A. D. (1997): Biochemical characterization of the *aba2* and *aba3* mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 114: 161-166.
- Seeman, J. R. and Sharkey, T. D. (1986): Salinity and nitrogen effects on photosynthesis RuBPCase and metabolite pool sizes in *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Physiol.* 82: 555-560.

- Selye, H. (1956): The stress of life. McGraw-Hill Book. Co. Inc., New York.
- Sen Gupta, A., Heinen, J. L., Haladay, A. S., Burke, J. J. and Allen, R. D. (1993a): Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 90: 1629-1633.
- Sen Gupta, A., Webb, R. P., Holaday, A. S. and Allen, R. D. (1993b): Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiol.* 103: 1067-1073.
- Seo, M., Peeters, A. I. M. and Koiwai, H. (2000): The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 12908-12913.
- Shalata, A. and Tal, M. (1998): The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiol. Plant.* 104: 169-174.
- Shannon, M. C., Grieve, C. M. and Francois, L. E. (1990): Whole-plant response to salinity. In: Dekker, M. and Wilkinson, R. E. (eds.): *Plant Environmental Interactions*, pp. 199-244. New York, USA.
- Sies, H. (1985): Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. (ed.): *Oxidative stress*, pp. 1-8. Academic Press Inc., London. ISBN 0-12-642760-7.
- Slooten, L., Capiau, K., Van Camp, W., Van Montagu, M., Sybesma, C. and Inzé, D. (1995): Factors affecting the enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco overexpressing manganese superoxide dismutase in the chloroplasts. *Plant Physiol.* 107: 737-750.
- Smirnoff, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. A. (1988): Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175: 408-413.
- Smith, I. K., Vierheller, T. L. and Thorne, C. A. (1989): Properties and functions of glutathione reductase in plants. *Physiol. Plant.* 77: 449-456.
- Stallings, W. C., Pattridge, K. A., Strong, R. K. and Ludwig, M. L. (1984): Manganese and iron superoxide dismutase are structural homologs. *J. Biol. Chem.* 259: 10695-10699.

- Takahashi, Y. and Nagata, T. (1992): par B: an auxin-regulated gene encoding glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 89: 56-59.
- Teppermann, J. M. and Dunsmuir, P. (1990): Transformed plants with elevated levels of chloroplastic SOD are not more resistant to superoxide toxicity. *Plant Mol. Biol.* 14: 501-511.
- Tolbert, N. E. (1982): Leaf peroxisomes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 386: 254-268.
- Tsang Ed, W. T., Bowler, C., Herouart, D., Van Camp, W., Villaroel, R., Genetello, C., Van Montagu, M. and Inzé, D. (1991): Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. *Plant Cell* 3: 783-792.
- Tucker, D. E. and Ort, D. R. (1998): The circadian activity of nitrate reductase in tomato is driven by changes in protein level. In: Sánchez-díaz, M., Irigoyen, J. J., Aguirreolea, J. and Pithan, K. (eds.): *Crop development for cool and wet climate of Europe*. pp. 25-34. OOPEC, Luxembourg. ISBN 92-828-6947-4.
- Upadhyaya, A., Sankhla, D., Davis, T. D., Sankhla, N. and Smith, B. N. (1985): Effect of paclobutrazol on the activities of some enzymes of activated oxygen metabolism and lipid peroxidation in senescing soybean leaves. *J. Plant Physiol.* 121: 453-461.
- Yu, Q. and Rengel, Y. (1999): Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Plant Sci.* 142: 1-11.
- Volokita, M. (1991): The carboxy-terminal end of glycolate oxidase directs a foreign protein into tobacco leaf peroxisomes. *Plant J.* 1 (3): 361-366.
- Walker-Simmons, M., Kudra, D. A. and Warner, R. L. (1989): Reduced accumulation of ABA during water stress in a molybdenum cofactor mutant of barley. *Plant Physiol.* 90: 728-733.
- Willekens, H., Chamnongpol, S., Davey, M., Schraudner, M., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D. and Van Camp, W. (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and as indispensable for stress defense in C₃ plants. *Plant J.* 16: 4806-4816.
- Wingsle, G. and Karpinski, S. (1996): Differential redox regulation by glutathione of glutathione reductase and CuZn-superoxide dismutase gene expression in *Pinus sylvestris* L. needles. *Planta* 198: 151-157.
- Woodbury, W., Spencer, A. K. and Stahmann, M. A. (1971): An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44: 301-305.
- Zeleneva, I. V., Savost'yana, E. V. and Khawkin, É. E. (1982): Enzyme distribution of the cortex and stele in cytodifferentiating maize seedlings. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 177: 97-106.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani az MTA Mezőgazdasági Kutatóintézete vezetőségének mindazokért a támogatásokért, amely lehetővé tette ezen munka elvégzését és a disszertáció elkészítését.

Köszönettel tartozom Dr. Erdei Lászlónak, azért a támogatásért, ami sokat segített nekem már az egyetemi éveimtől kezdve. Köszönöm a lehetőséget Dr. Herman Lips professzornak, hogy a laboratóriumában dolgozhattam másfél évet, és így sokat tanulva rengeteg tapasztalatra tehettem szert. Köszönettel tartozom Dr. Veisz Ottónak, aki segítségével és biztatásával egyengette a dolgozat megszületését.

Köszönettel tartozom mindazoknak a szegedi és martonvásári kollégáknak, különösen Ördög Mónikának és Grósz Gyulánénak, akik nagyban hozzájárultak a kísérletek sikeres lefolytatásához, és a mérések zökkenőmentes kivitelezéséhez.

Köszönöm Dr. Janda Tibornak azt a türelmet és segítséget, amit a dolgozat javítása közepette irányomba tanusított.

Végül, de nem utolsósorban köszönettel tartozom szüleimnek a lehetőségért, hogy mindig a tanulásra összpontosíthattam, és férjemnek azért a végtelen türelemért és szeretetért, amivel a munka, és a dolgozat írása közben engem körülvelt.